

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakogenetik

Charakterisierung der putativen Promotorregion einer Variante der  
 $\beta$ -Untereinheit der humanen Farnesyltransferase

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Patrick Stelmach  
aus Essen

2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. H.S. Bachmann  
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. R. Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2017

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits publiziert oder auf Kongressen vorgestellt:

Characterization of the promoter region of a variant of the  $\beta$ -subunit of the human farnesyltransferase.

**Stelmach P.**, Manthey I., Siffert W., Bachmann H.S.

81st Annual Meeting of the German Society of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology,

*Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 388 (S1) 217 (2015)

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1 Die Proteinbiosynthese .....	7
1.2 Initiation und Regulation der m-RNA-Expression .....	7
1.3 Translation und posttranslationale Modifikation .....	8
1.4 Die Farnesyltransferase .....	9
1.4.1 Funktion der Farnesyltransferase.....	10
1.4.2 Bedeutung der Farnesyltransferase bei Krebserkrankungen .....	10
1.4.3 Bedeutung der Farnesyltransferase bei weiteren Erkrankungen .....	11
1.4.4 Verschiedene Varianten der $\beta$ -Untereinheit der Farnesyltransferase ....	12
1.5 Ziel der Arbeit.....	13
 <b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	 <b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Geräte .....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.3 Restriktionsenzyme .....	16
2.1.4 Oligonukleotide.....	17
2.1.5 Medien .....	19
2.1.6 Zellkulturreagenzien .....	20
2.1.7 Vektoren .....	20
2.1.8 Antikörper .....	20
2.1.9 Chemikalien .....	21
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Präparation von humaner genomischer DNA aus Blut .....	21
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	21
2.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA-Produkten.....	24
2.2.4 DNA-Aufreinigung und Konzentration .....	25

2.2.5 Konzentrationsbestimmung der DNA .....	25
2.2.6 5'RACE.....	26
2.2.7 Arbeiten mit Restriktionsendonukleasen .....	28
2.2.8 Klonierung .....	29
2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	36
2.2.10 DNA-Sequenzierung .....	37
2.2.11 Zellkultur.....	37
2.2.12 Gewinnung von Ganzzelllysaten .....	38
2.2.13 Gewinnung von Zellkernextrakten .....	38
2.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	39
2.2.15 Validierung des Überexpressionsplasmids .....	40
2.2.16 Reporterassay .....	43
2.2.17 Transfektion von HEK-293-Zellen für EMSA-Versuche.....	45
2.2.18 EMSA .....	46
2.2.19 Statistik und Grafik .....	49
 <b>3 ERGEBNISSE .....</b>	 <b>51</b>
3.1 In silico Analysen .....	51
3.1.1 <i>In silico</i> Identifizierung der putativen <i>FNTB</i> -F2-Promotorregion.....	51
3.1.2 <i>In silico</i> Suche nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen .....	51
3.1.3 <i>In silico</i> Planung einer HNF1 $\alpha$ -Negativkontrolle für den EMSA.....	54
3.2 Exp. Identifikation des Transkriptionsstartpunktes der <i>FNTB</i> -F2-Variante .....	55
3.3 Basale Promotoraktivität .....	56
3.3.1 Basale Promotoraktivität in HEK-293-Zellen .....	56
3.3.2 Basale Promotoraktivität in A2780-Zellen .....	58
3.3.3 Basale Promotoraktivität in HEPG2-Zellen .....	59
3.4 Testung des HNF1 $\alpha$ -Expressionsplasmids .....	60
3.5 Interaktion von HNF1 $\alpha$ mit den vorhergesagten Bindungsstellen .....	61
3.5.1 Evaluierung der HNF1 $\alpha$ -Positiv- und Negativkontrolle .....	62
3.5.2 EMSA-Screening auf potentielle HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen.....	63
3.5.3 Evaluierung der identifizierten HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen .....	63
3.6 Promotoraktivität unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation .....	66

<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
4.1 Identifikation der <i>FNTB</i> -F2-Promotorregion .....	67
4.2 Interpretation der basalen Promotoraktivitätsmessungen in HEK-293-Zellen .....	68
4.3 Interpretation der basalen Promotoraktivitätsmessungen in A2780- und HEPG2-Zellen .....	70
4.4 Bedeutung von HNF1 $\alpha$ bei der Regulation der <i>FNTB</i> -F2-Promotoraktivität .....	73
4.5 Assoziation zwischen HNF1 $\alpha$ und Farnesylierung bei Diabetes mellitus .....	74
4.6 Ausblick .....	75
 <b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	 <b>78</b>
 <b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	 <b>79</b>
 <b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	 <b>86</b>
 <b>8 LEBENS LAUF .....</b>	 <b>90</b>

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Die Proteinbiosynthese**

Der Weg von der genetischen Information der DNA bis hin zum fertigen Protein wird als Genexpression bezeichnet. Dabei wird die genetische Information der doppelsträngigen DNA zunächst in einzelsträngige m-RNA umgeschrieben (Transkription) und dann in eine Proteinsequenz übersetzt (Translation). Die genetische Information liegt dabei in Form von Basentriplets vor. Diese bestehen aus einer variablen Abfolge der Grundbausteine der DNA, den Nukleotiden mit den vier spezifischen Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Diese lineare Sequenz von Nukleotiden wird im Zellkern durch die RNA-Polymerase II in eine ebenfalls lineare Sequenz m-RNA transkribiert. Die m-RNA entspricht dabei in Orientierung und Sequenz dem nicht-transkribierten DNA-Strang, mit der Ausnahme, dass in der m-RNA Sequenz Thymin gegen Uracil (U) ersetzt ist. Auch hier bilden drei Nukleotide eine Informationseinheit (Codon). Die so gebildete prä-mRNA wird noch weiteren Modifikationen unterworfen, die in ihrer Gesamtheit als RNA-Reifung bezeichnet werden: Beim Spleißen werden die nicht kodierenden DNA-Abschnitte, die Introns, herausgetrennt und die kodierenden DNA-Abschnitte, die Exons, anschließend miteinander verknüpft. Außerdem wird am 5'-Ende der m-RNA ein modifiziertes Guanin-Nukleotid mit Methylgruppe (Cap-Struktur) und am 3'-Ende eine Abfolge von Adenin-Nukleotiden, der Poly-A-Schwanz angefügt. Anschließend wird die reife m-RNA aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert und dort an den Ribosomen in eine Polypeptidkette umgesetzt. Ein m-RNA-Codon codiert dabei für eine Aminosäure (Hennig, 2010; Knippers, 2001; Strachan et al., 2005).

## **1.2 Initiation und Regulation der m-RNA-Expression**

Um mit der Transkription genetischer Information beginnen zu können ist die RNA-Polymerase II auf die Interaktion mit bestimmten Proteinen, den Transkriptionsfaktoren angewiesen. Diese wiederum binden an kurzen Sequenzelementen, die sich stromaufwärts in 5'-Richtung der kodierenden Sequenz befinden und in ihrer Gesamtheit den Promotor eines Gens bilden. Eukaryotische Promotoren besitzen dabei eine große Sequenzvariabilität. Wichtige Sequenzmuster, die sich allerdings immer wieder finden lassen und daher als allgemeine Motive bezeichnet werden sind TATA-Boxen mit der Konsensussequenz TATA-AA oder Varianten davon (Smale et al., 2003) und GC-Boxen

mit der Konsensussequenz GGGCGG (Todd et al., 2008). Bei den Transkriptionsfaktoren wird zwischen allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren unterschieden. Allgemeine Transkriptionsfaktoren werden ubiquitär exprimiert und binden an allgemeinen Promotormotiven. Sie sind für die Initiation jeder Transkription notwendig. Für die spezifische Genregulation sind hingegen spezifische Transkriptionsfaktoren notwendig. Diese kommen nur in bestimmten Zellen vor und sind an der Regulation eines zellspezifischen Gens beteiligt. Sie binden an spezifische Elemente im Promotorbereich und können die Transkription eines spezifischen Gens sowohl fördern als auch hemmen. (Knippers, 2001; Strachan et al., 2005).

### **1.3 Translation und posttranslationale Modifikation**

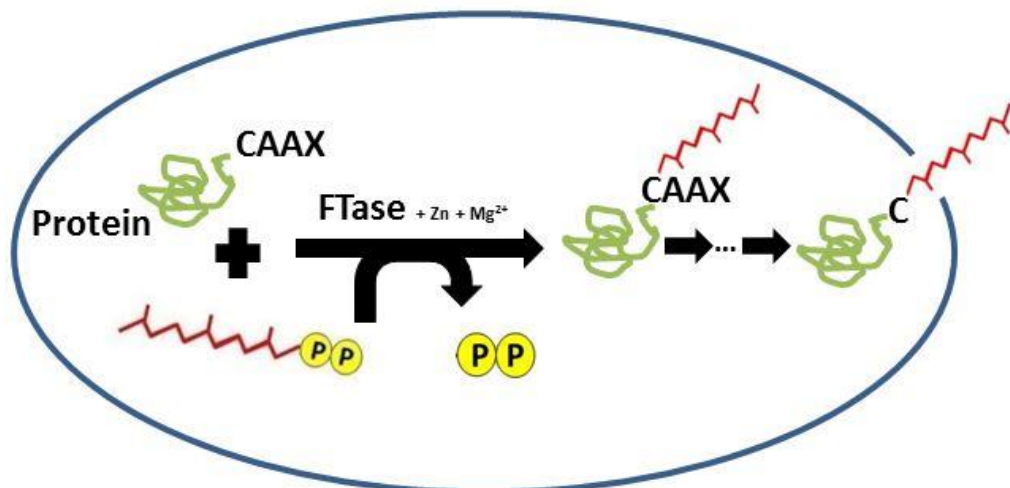
An den Ribosomen im Cytoplasma wird nur der zentrale Bereich der m-RNA in eine Polypeptidsequenz umgesetzt. Am 5'- und 3'-Ende der m-RNA befinden sich Bereiche, die nicht in eine Proteinsequenz übersetzt werden und daher als 5'- und 3'-untranslatierte Regionen (5'-UTR, 3'-UTR) bezeichnet werden (Mazumder et al., 2003; Pickering et al., 2005). Als Start der Translation dient das Codon AUG, welches für die Aminosäure Methionin kodiert. Allerdings nur wenn dieses in eine spezielle Erkennungssequenz, der Kozak-Sequenz eingebettet ist (Kozak, 1987). Anschließend werden solange Aminosäuren zu einer Polypeptidkette zusammengefügt bis eines der Stopp Codons UAA, UAG oder UGA erreicht ist. Häufig durchlaufen die Translationsprodukte anschließend noch verschiedene chemische Modifikationen, die in ihrer Gesamtheit als posttranslationale Modifikationen bezeichnet werden. Ziel ist das Erreichen der vollen Funktionstüchtigkeit des Proteins. Die kovalente Verknüpfung von Aminosäureseitenketten mit Kohlenhydratgruppen, die Glykosylierung ermöglicht es den gebildeten Glykoproteinen u.a. als Rezeptoren, Hormone oder Antikörper zu fungieren (Brooks, 2006). Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die kovalente Verknüpfung von Aminosäureseitenketten mit Lipidgruppen. Diese Lipidgruppen fungieren dabei als Membrananker und ermöglichen es somit dem modifizierten Protein sich an eine hydrophobe Lipiddoppelschicht anzuheften. Es gibt verschiedene Arten von Lipidgruppen, die im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation auf Proteine übertragen werden: Myristinsäure (J. I. Gordon et al., 1991; Maurer-Stroh et al., 2002), Palmitinsäure (Morello et al., 1996; Resh, 1999), Glykosylphosphatidylinositol (Chatterjee et al., 2001; Eisenhaber et al., 2001) und Prenylgruppen. Bei der Prenylierung von Proteinen wird dabei noch weiter unterschieden zwischen der Geranylgeranylierung, die durch die



Geranylgeranyltransferasen katalysiert wird und der Farnesylierung, die durch die Farnesyltransferase katalysiert wird (Palsuledesai et al., 2015).

## 1.4 Die Farnesyltransferase

Bei der Farnesyltransferase (FTase) handelt es sich um ein heterodimeres Enzym welches aus einer  $\alpha$ -Untereinheit von 48 kDa (FNTA) und einer  $\beta$ -Untereinheit von 46 kDa (FNTB) besteht (Zhang et al., 1996). Die Farnesyltransferase gehört zur Gruppe der Prenyltransferasen zu der auch die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) und die Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II) gehören (Palsuledesai et al., 2015). Während sowohl die Farnesyltransferase als auch die Geranylgeranyltransferase-I die gleiche  $\alpha$ -Untereinheit besitzen, unterscheiden sie sich in der  $\beta$ -Untereinheit (Seabra et al., 1991). Die  $\beta$ -Untereinheit trägt die Bindungstaschen für das Substrat und die Lipidgruppe und beinhaltet das katalytische Zentrum des Enzyms (H. W. Park et al., 1997). Die Farnesyltransferase erkennt Proteine als ihre Substrate, die an ihrem C-terminalen Ende eine CAAX-Erkennungssequenz aufweisen. Dabei steht das X für die Aminosäuren Methionin, Serin, Alanin oder Glutamin. A steht für eine beliebige aliphatische Aminosäure und C für die Aminosäure Cystein (Houglund et al., 2010). Im Rahmen der enzymatischen Reaktion wird eine Farnesylgruppe bestehend aus 15 Kohlenstoffatomen vom Farnesylpyrophosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat kovalent an die Seitenkette des Cysteins angefügt (Abbildung 1). Dabei wird als Cofaktor Zink (Zn) und Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) benötigt (Yang et al., 2010).



**Abbildung 1: Funktion der Farnesyltransferase.** Im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation überträgt die FTase eine Lipidgruppe bestehend aus 15 Kohlenstoffatomen unter Abspaltung von Pyrophosphat auf das C-terminale Ende von Proteinen, die dort über eine CAAX-Erkennungssequenz verfügen. Anschließend kann sich das Protein mittels der Lipidkette an die hydrophobe Zellmembran anheften.

### **1.4.1 Funktion der Farnesyltransferase**

Die Farnesyltransferase überträgt den Farnesylrest vom Farnesylpyrophosphat auf eine ganze Reihe von Proteinen. Durch diesen Lipidanker sind die Proteine in der Lage mit anderen Proteinen zu interagieren (Marshall, 1993) oder sich an die hydrophobe Zellmembran anzuhängen und so ihre Funktion innerhalb von Signalkaskaden wahrzunehmen (Casey, 1994). Typische Proteine, die posttranslational farnesyliert werden sind die Mitglieder der RAS-Proteinfamilie der kleinen GTPasen wie K-RAS, H-RAS, N-RAS, RhoB, RhoE, RheB. Aber auch Kinetochor Proteine wie CENP-E und CENP-F oder die Rhodopsin Kinase werden posttranslational farnesyliert (Maurer-Stroh et al., 2003). Heute ist bei mehr als 100 Proteinen eine posttranslationale Farnesylierung experimentell belegt und nach Datenbankanalysen tragen 587 Proteine eine Erkennungssequenz für die Farnesyltransferase (Berndt et al., 2011). Da viele farnesylierte Proteine bei Krebserkrankungen eine zentrale Rolle spielen, wurden in den vergangenen Jahren Hemmstoffe der Farnesyltransferase entwickelt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an Tieren und Menschen getestet.

### **1.4.2 Bedeutung der Farnesyltransferase bei Krebserkrankungen**

Im Durchschnitt weisen ca. 30 % aller humanen Tumoren Mutationen des RAS-Proteins auf. Beim pankreatischen Adenokarzinom lässt sich sogar bei 90 % aller Tumore eine RAS-Mutation finden, beim Kolonkarzinom sind es ca. 50 % und beim malignen Melanom lässt sich immerhin noch bei 20 % eine RAS-Mutation nachweisen (Sousa et al., 2005). Die Tatsache, dass RAS-Proteine posttranslational farnesyliert werden und dieser Schritt essentiell für die Funktion dieser Proteine ist, führte zur Entwicklung von zahlreichen Hemmstoffen der Farnesyltransferase.

Die Testung an Tieren war zunächst sehr vielversprechend. So zeigte der Einsatz des Farnesyltransferasehemmstoffs L-744,832 an Mausmodellen mit Karzinomen der Mamma- und Speicheldrüsen eine rasche Reduktion des Tumorzvolumens ohne nennenswerte systemische Toxizität (Kohl et al., 1995). Auch an einigen humanen Krebszelllinien konnte mit Farnesyltransferasehemmern das Wachstum signifikant verlangsamt werden. So zeigte sich bei der Testung an 53 humanen Tumorzelllinien, dass ca. 75 % unter Behandlung mit dem Farnesyltransferasehemmer R115777 im Wachstum gehemmt wurden (End et al., 2001).

In der klinischen Testung am Menschen waren die Ergebnisse dann bezüglich der Wirkung teilweise gegensätzlich. So konnte in der klinischen Phase-III-Testung von R115777 an einem Kollektiv aus Patienten mit rezidiviertem kolorektalen Karzinom keine

Verbesserung des Gesamtüberlebens gegenüber der Standardtherapie gezeigt werden (Rao et al., 2004). In einer weiteren Phase-III-Studie an einem Kollektiv aus Patienten mit Pankreaskarzinom war die Kombinationstherapie von R115777 mit Gemcitabine ebenfalls der etablierten Monotherapie mit Gemcitabine hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht überlegen (Van Cutsem et al., 2004). Es gab sogar Fälle in denen die zusätzliche Gabe eines Farnesyltransferasehemmers zur etablierten Standardtherapie die Prognose der Patienten verschlechterte. So konnte in einer Phase-II-Studie an einem Patientenkollektiv mit Ovarialkarzinom bei Zugabe des Farnesyltransferasehemmers Lonafernib zur Standard-Chemotherapie eine signifikante Verkürzung sowohl des Gesamtüberlebens als auch des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zur alleinigen Standardtherapie gezeigt werden (Meier et al., 2012). Es gab allerdings auch Erfolge in der klinischen Testung mit Farnesyltransferasehemmern am Menschen. So konnte die zusätzliche Gabe von Tipifarnib zur präoperativen Standard Chemotherapie bei Brustkrebspatientinnen im klinischen Stadium IIB-IIIC die komplette pathologische Responstrate, d.h. kein Nachweis vitaler residualer Tumorzellen im Präparat bei der anschließenden Operation erhöhen (Sparano et al., 2009). Auch bei älteren Patienten (> 75 Jahre) mit akuter myeloischer Leukämie zeigte sich unter Einsatz von Tibifarnib ein positiver Effekt. Eine Phase-II-Studie ergab eine Ansprechrate von 24 % und bei 14 % der Patienten kam es sogar zur kompletten Remission während unter konventioneller Chemotherapie diese Patienten eine sehr schlechte Prognose hatten (Lancet et al., 2007).

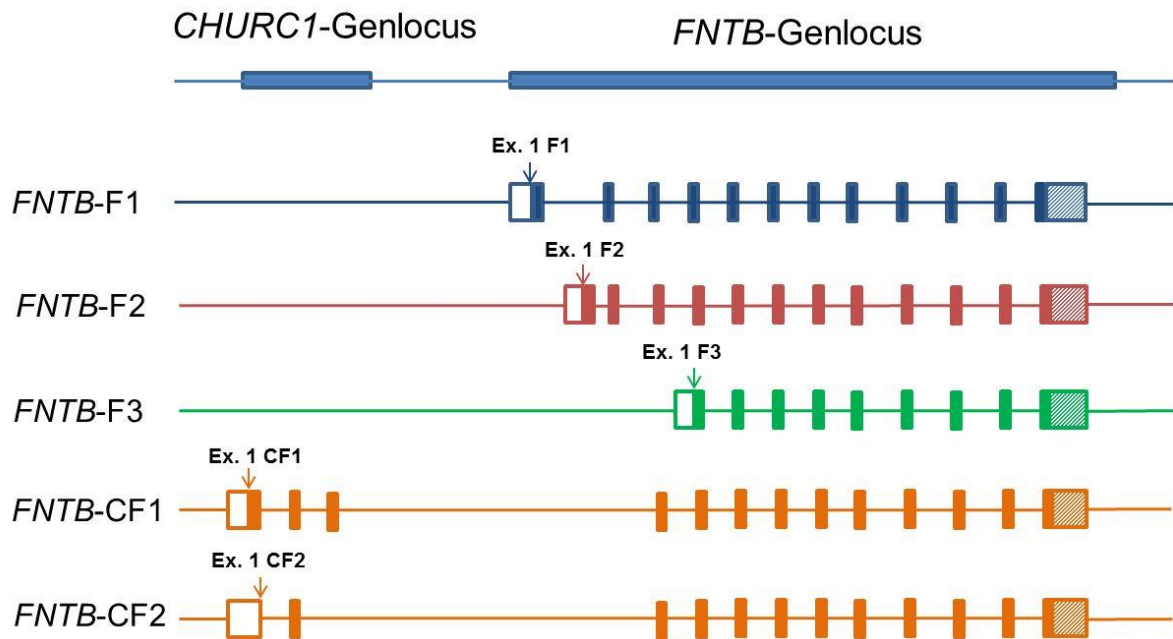
### **1.4.3 Bedeutung der Farnesyltransferase bei weiteren Erkrankungen**

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass der Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen auch außerhalb der Onkologie bei einigen Erkrankungen Nutzen hat bzw. haben könnte. So wurden 25 Patienten mit Hutchinson-Gilford-Syndrom mit dem Farnesyltransferasehemmer Lonafernib behandelt. Beim Hutchinson-Gilford-Syndrom handelt es sich um eine autosomal-dominante Erkrankung, bei der es zu einem schweren und verfrüht einsetzenden Alterungsprozess kommt, der sich insbesondere an Haut, Blutgefäßen und dem Skelett manifestiert und bereits in der frühesten Kindheit einsetzt. Im Rahmen dieses klinischen Versuches profitierten die Patienten von einer Lonafernib-Behandlung. Es zeigten sich positive Auswirkungen auf die Blutgefäßsteifheit, die Knochenstruktur und den audiologischen Status der Patienten (L. B. Gordon et al., 2012). In Mausexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass der Einsatz des Farnesyltransferasehemmers FTI-277 bei experimentell induzierter schwerer akuter Pankreatitis das Ausmaß der hämorrhagischen und ödematösen Transformation des Pankreas abmildert und die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten reduziert. Dies

lässt hoffen, dass der Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen in Zukunft auch im Rahmen der Therapie der akuten Pankreatitis eine Rolle spielen könnte (Merza et al., 2014). Duluc et al. konnten zudem kürzlich zeigen, dass der Einsatz des Farnesyltransferasehemmers Tipifarnib im Mausmodell protektiv gegen die Entwicklung einer hypoxie induzierten pulmonalen Hypertonie wirkt (Duluc et al., 2017).

#### 1.4.4 Verschiedene Varianten der $\beta$ -Untereinheit der Farnesyltransferase

In noch nicht publizierten Vorarbeiten konnten Bachmann et al. zeigen, dass sich die  $\beta$ -Untereinheit der Prenyltransferasen nicht nur zwischen der FTase und der GGTase-I unterscheidet, sondern dass auch noch verschiedene Varianten der  $\beta$ -Untereinheit der FTase selbst existieren, die am Genlocus 14q.23.3 kodiert sind und die Bezeichnungen *FNTB-F1*, -F2, -F3, -CF1 und -CF2 tragen (Abbildung 2). Die bereits bekannte *FNTB-F1*-Variante besteht aus 12 Exons und einem stromaufwärts in 5'-Richtung gelegenen Promotorbereich. Die neu beschriebene *FNTB-F2*-Variante stellt eine Transkriptvariante der *FNTB-F1*-Variante da. Sie verfügt über einen alternativen Transkriptionsstartpunkt, der sich im 1. Intron, zwischen Exon 1 und 2 der *FNTB-F1*-Variante befindet. Somit unterscheiden sich die *FNTB-F1*- und *F2*-Variante nur hinsichtlich ihres Promotorbereiches und des 1. Exons voneinander. Ab Exon 2 sind beide Varianten identisch. Die *FNTB-F3*-Variante stellt ebenfalls eine Transkriptvariante der *FNTB-F1*-Variante dar. Sie hat einen alternativen Transkriptionsstartpunkt im Bereich des Exon 4 der *FNTB-F1*-Variante. Bei den *FNTB-CF1* und *CF2*-Varianten handelt es sich um sog. Readthrough Varianten. Dabei startet die Transkription der prä-mRNA im Bereich des *CHURC1*-Gens, läuft dann durch bis zum *FNTB*-Gen (Readthrough) und endet am gleichen 3'-Ende wie die Transkription der *FNTB-F1*-, *F2*- und *F3*-Varianten. Durch den Vorgang des alternativen Spleißens wird anschließend aus der transkribierten prä-mRNA ein Teilbereich zwischen dem transkribierten *CHURC1*-Gens und dem Exon 2 der *FNTB-F1*-, *F2*- und *F3*-Variante herausgeschnitten. Die *CHURC1-FNTB* Readthrough Varianten wurden bereits im Rahmen eines Screenings auf Conjoined Genes durch Prakash et al. identifiziert (Prakash et al., 2010) und in entsprechende Datenbanken eingetragen (NCBI Referenz Sequenzen NM-001202559.1 und NM\_001202558.1).



**Abbildung 2: Varianten der  $\beta$ -Untereinheit der humanen FTase.** Dargestellt ist der *CHURC1*-Genlocus, der *FNTB*-Genlocus und die daraus transkribierten prä-mRNAs der 5 *FNTB*-Varianten. Die Rechtecke symbolisieren dabei die Exons. Farblich ausgefüllte Bereiche stellen die kodierenden Bereiche dar. Die nicht ausgefüllten Rechtecke kennzeichnen die 5'-untranslatierten DNA-Regionen und die schraffierten Rechtecke die 3'-untranslatierten Regionen. Abbildung nach Bachmann et al. unpubliziert.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Tatsache, dass der Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen bei humanen Krebserkrankungen bislang zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führte, macht es notwendig, nach Erklärungsmodellen für dieses unterschiedliche Ansprechverhalten zu suchen. Insbesondere der enttäuschende Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen bei Pankreaskarzinomen (Van Cutsem et al., 2004), bei denen in bis zu 90 % der Tumoren RAS-Mutationen zu finden sind (Sousa et al., 2005), legt den Schluss nahe, dass noch weitere Mechanismen vorliegen müssen, die bislang einem erfolgreichen Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen entgegenstehen. Der erfolgreiche Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen beim Hutchinson-Gilford-Syndrom zeigt zudem, dass die Farnesylierung und deren Hemmung auch bei komplexen Erkrankungen außerhalb des onkologischen Bereiches eine große Bedeutung hat. Die Entdeckung der verschiedenen Varianten der  $\beta$ -Untereinheit der FTase und deren unterschiedliche Expression in verschiedenen Geweben könnte ein möglicher Ansatzpunkt sein, um mehr über die komplexe Wirkung der Farnesylierung und deren Hemmung bei verschiedenen Erkrankungen zu erfahren. Dafür sind weitere Kenntnisse auch über die Aktivität und

Regulation der verschiedenen *FNTB*-Varianten essentiell. Bisher ist über die Aktivität und Regulation der *FNTB*-Varianten allerdings nichts bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es den putativen Promotorbereich der *FNTB*-F2-Variante zu charakterisieren und den Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Promotoraktivität zu evaluieren. Methodisch kommen dabei verschiedene Untersuchungen in Frage, um den Promotorbereich eines Gens zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der putative Promotorbereich der *FNTB*-F2-Variante zunächst möglichst genau lokalisiert werden. Dies soll sowohl durch verschiedene *in silico* Analysen als auch experimentell mittels einer 5'Rapid amplification of cDNA ends (5'RACE) Untersuchung erfolgen.

Der so identifizierte DNA-Abschnitt soll anschließend weiter experimentell auf seine Promotorfunktion untersucht werden. Dafür ist es vorgesehen diesen Bereich zu klonieren- und unterschiedlich lange Deletionskonstrukte herzustellen. Anschließend soll die basale Promotoraktivität in unterschiedlichen Zelllinien mittels Luciferase-Reporterassay bestimmt werden um Erkenntnisse über die Grundaktivität der *FNTB*-F2-Variante in unterschiedlichen Zelllinien zu gewinnen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es die Auswirkungen und Bedeutung verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die *FNTB*-F2-Promotoraktivität zu evaluieren. Dafür soll der Promotorbereich zunächst *in silico* auf das Vorhandensein von typischen Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Anschließend soll die Bedeutung ausgewählter Transkriptionsfaktoren auf die *FNTB*-F2-Promotoraktivität auch experimentell weiter untersucht werden. Dafür sollen die Faktoren zunächst kloniert werden um in einem anschließenden Überexpressionsexperiment ihre Bedeutung bei der Regulation der *FNTB*-F2-Promotoraktivität untersuchen zu können. Ferner sollen mittels eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) die *in silico* vorhergesagten Bindungsstellen auch experimentell verifiziert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte**

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaagen	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Autoklav	Systec, Wettenberg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Electrophoresis Power Supply	Appligene oncor
Fluoreszenzscanner Odyssey	LiCOR, Lincoln, NE, USA
Luminometer	Berthold Technologies, Köln, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Nikon
Mikrowelle	Severin
pH-Meter	VWR international, Leuven, Belgien
Photometer	peQLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pipetten: 0,5-10, 5-40, 20-200, 200-1000 µl 0,5-10 ml	Finnpipette, Thermo Labsystems Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Sterilfilter Ministar, Porengröße: 0,2 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Jena
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zellzähler	Merck, Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland Rotina 420R, Hettich, Mülheim a.d. Ruhr, Deutschland

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
Gewebekulturschale, 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Polystyrene Conical Tube, 15 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Microplate 96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Multiwellplatte, 6 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen, 13 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten, 5 ml und 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen, 20 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Transferpipette, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette, Polyethylene, 7,1 ml	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Whatman Transfer-Membran, Nitrocellulose	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Whatman Chromatographie Papier, 17 CHR	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflasche, 250 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale, 10 cm	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

## 2.1.3 Restriktionsenzyme

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Restriktionsenzyme**

Hersteller	Enzym
<i>AclI</i> , <i>AlwNI</i> , <i>BbvCI</i> , <i>BglII</i> , <i>BspMI</i> , <i>Eco53kI</i> , <i>HindIII</i> , <i>MscI</i> , <i>PciI</i> , <i>Scal</i> , <i>SmlI</i> , <i>SphI</i> , <i>Sspl</i> , <i>XmnI</i>	New England Biolabs
<i>NotI</i>	Thermo Scientific
<i>SacI</i> , <i>SpeI</i>	Fermentas



## 2.1.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (OliN) wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

### 2.1.4.1 Oligonukleotide für die PCR

**Tabelle 4: Oligonukleotide für die PCR**

Name des OliN	Sequenz (5' nach 3')	Produktgröße	Annealingtemperatur	Anwendung
<i>FNTB</i> F2 Se <i>FNTB</i> F2 As	5'-tggaagcctgtactttg ca-3' 5'atccatgatggcttctcc c-3'	1985 bp	62°C	Promotor- klonierung
HNF1α Se  HNF1α As	5'-atggtttctaaactgagcc ag-3' 5'-ttactgggaggaagaggc ca-3'	1896 bp	61°C	Klonierung des HNF1α Transkrip- tionsfaktors
SP6  T7	5'-ttaggtgacactatagaat ac-3' 5'-taatacgactcactatagg gcg-3'	Variabel	60°C	Kolonie-PCR und Sequenzie- rung pGEM-T Easy Vektor
pGL4.10 Se pGL4.10 As	5'-ctagcaaaataggct gtccc-3' 5'-ggtggctttaccaccag taccgg-3'	Variabel	66°C	Kolonie-PCR und Sequenzie- rung pGL4.10 Vektor
pcDNA3.1 (+) Se pcDNA3.1 (+) As	5'-gactcactatagggaga ccc-3' 5'-actagaaggcacagt cgagg-3'	Variabel	60°C	Kolonie-PCR und Sequenzie- rung pcDNA3.1(+) Vektor
GSP <i>FNTB</i> F2 As	5'-tcaccagagggtcccctt aaca-3'	Variabel	Touchdown	5'RACE PCR

### 2.1.4.2 Oligonukleotide für den EMSA

Mittels *in silico* Analyse durch das Computerprogramm MatInspector von Genomatix (www.genomatix.com) wurden 12 mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) in der Promotorregion vorhergesagt. Um die vorhergesagten Bindungsstellen experimentell zu überprüfen wurden Oligonukleotide generiert (Tabelle 5), die die betreffende Sequenz beinhalten. Als Positivkontrolle wurde die HNF1 $\alpha$ -Konsensussequenz verwendet (Kuo et al., 1991). Als Negativkontrolle kam ein selbst validiertes Oligonukleotid mit drei im Vergleich zur Konsensussequenz veränderten Nukleotiden zum Einsatz (siehe 3.1.3).

**Tabelle 5: Sequenzen der EMSA Oligonukleotide.** Die OliN beinhalten die vorhergesagten HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen (fettgedruckt und unterstrichen), vier zusätzliche Nukleotide der Promotorsequenz in 5'- und 3'-Richtung und die LUEGO Bindungssequenz am 3'-Ende (kursiv geschrieben). Die Nummern beziehen sich auf den Translationsstartpunkt der F2-Variante.

Bezeichnung und Lokalisation der OliN im <i>FNTB</i> -F2-Promotor		Sense und Antisense Sequenz der OliN (5' nach 3')
-135/-159	Se As	5'-aaaa <u>tg</u> tttaattagaaacgctgtggccagaccagggcac-3' 5'-ccac <u>ag</u> cggtttcttaattaacattttccagaccagggcac-3'
-166/-190	Se As	5'-aaag <u>ag</u> tttaatatctatagctatctccagaccagggcac-3' 5'-agat <u>ag</u> ctatagatattaactctttccagaccagggcac-3'
-377/-401	Se As	5'-ttgg <u>ta</u> ataggaggttaaaccctataaccagaccagggcac-3' 5'-ttat <u>ag</u> gtttaactcctattaccaaccagaccagggcac-3'
-397/-421	Se As	5'-ttta <u>ttt</u> gttaagcaataatttggtccagaccagggcac-3' 5'-acca <u>aat</u> tattgcttaacaaataaaccagaccagggcac-3'
-402/-426	Se As	5'-ctcg <u>gtt</u> tatttgttaagcaataatccagaccagggcac-3' 5'-atta <u>ttg</u> cttaacaaataaaccgagccagaccagggcac-3'
-896/-920	Se As	5'-tttc <u>ag</u> ttttaactaaagcttccatccagaccagggcac-3' 5'-atgg <u>aag</u> cttttaggttaaaactgaaaccagaccagggcac-3'
-972/-996	Se As	5'-ggta <u>gg</u> ttaatgatacattcatcaaccagaccagggcac-3' 5'-ttga <u>tga</u> atgtatcattaaccacccagaccagggcac-3'
-979/-1003	Se As	5'-ccac <u>att</u> ggtaggttaatgatcatccagaccagggcac-3' 5'-atgt <u>at</u> cattaacctaccaatgtggccagaccagggcac-3'
-1593/-1617	Se As	5'-agtg <u>ttt</u> tacttattatctgaccttccagaccagggcac-3' 5'-aagg <u>tc</u> agataataagtaaaacactccagaccagggcac-3'
-1595/-1619	Se As	5'-caag <u>tg</u> ttttacttattatcttgacccagaccagggcac-3' 5'-ggtc <u>ag</u> ataataagtaaaacacttgccagaccagggcac-3'
-1811/-1835	Se As	5'-aaaa <u>tat</u> tttaactggagatttaaaccagaccagggcac-3' 5'-ttta <u>aat</u> ctccaggttaaaatattttccagaccagggcac-3'
-1926/-1950	Se As	5'-actt <u>tgg</u> caaaattagtaacaataaccagaccagggcac-3' 5'-ttat <u>tg</u> ttactaattttgccaaagtccagaccagggcac-3'
HNF1 $\alpha$ -Konsensus	Se As	5'-tatcgg <u>gt</u> taatgattaacacgtatccagaccagggcac-3' 5'-atacgt <u>gt</u> taatcattaacccgataccagaccagggcac-3'
HNF1 $\alpha$ -NK	Se As	5'-tatcgg <u>g</u> GCatgattaacacgtatccagaccagggcac-3' 5'-atacgt <u>gt</u> taatcatGCCccgataccagaccagggcac-3'

## 2.1.5 Medien

### 2.1.5.1 LB-Bakterienmedium

Um flüssiges Bakterienmedium zu erhalten wurden 25 g LB-Medium (Luria/Miller) der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) in 1 l Aqua dest. gelöst und für 20 Min. bei 121°C und 1,4 bar autoklaviert. Um festes Medium zu erhalten wurden zusätzlich 15 g Agar-Agar (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Nach der Sterilisation wurde bei einer Temperatur von 55°C 0,1 mg/ml Ampicillin und ggf. 0,05 mg/ml X-Gal zugegeben (je nach geplantem Verwendungszweck). Das Festmedium wurde anschließend unter der Sicherheitswerkbank in 10 cm Petrischalen abgefüllt und härtete bei Raumtemperatur aus.

### 2.1.5.2 Medium für ultrakompetente Zellen (NZY<sup>+</sup> Broth)

10 g NZ amine, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl wurden in 1 l Aqua dest. gelöst, mit NaOH auf einen pH Wert von 7,5 eingestellt, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden 25 ml dieses Ansatzes mit 312,5 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 312,5 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> und 500 µl Glucose (20 %) gemischt.

### 2.1.5.3 Medien für die Zellkultur

**Tabelle 6: Medien für die Zellkultur**

Medium	Hersteller
DMEM Medium mit 4,5 g/l D-Glucose	Gibco, life technologies™, Paisley, UK
RPMI Medium mit L-Glutamin	Gibco, Paisley, life technologies™, Paisley, UK
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (1 % Penicillin G und 1 % Streptomycin)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin (1 x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA (1 x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DPBS (1 x)	Gibco, life technologies™, Paisley, UK
Opti-MEM Medium	Gibco, life technologies™, Paisley, UK

## 2.1.6 Zellkulturreagenzien

**Tabelle 7: Reagenzien für die Zellkultur**

Reagenz	Hersteller
Lipofektamin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PLUS-Reagenz	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Indianapolis, IN, USA
Muse™ Count & Viability	Merck, Millipore, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.7 Vektoren

**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Vektoren**

Vektorbezeichnung	Vektoreigenschaften	Hersteller
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor	Promega, Madison, Wi, USA
pGL4.10	Reportergenvektor	Promega, Madison, Wi, USA
pGL4.74	Kontrollvektor für die Transfektionseffizienz	Promega, Madison, Wi, USA
pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor	Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA

## 2.1.8 Antikörper

**Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

Bezeichnung	Markierung	Verdünnung	Hersteller	Verwendung
HNF1 $\alpha$ (H-140): sc-10791	Keine	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Western Blot
HNF1 $\alpha$ (H-140): sc-10791 X	Keine	Keine	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	EMSA
GABP- $\beta$ 1/2 (H-265): sc-28684 X	Keine	Keine	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	EMSA
Goat anti-Rabbit IRDye 800CW	IRDye 800CW	1:10.000	Li-COR, Lincoln, NE, USA	Western Blot

### **2.1.9 Chemikalien**

Alle Chemikalien wurden in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; AppliChem, Darmstadt, Deutschland; Sigma, Steinheim, Deutschland.

## **2.2 Methoden**

Für die Beschreibung der Standardmethoden wurden wenn nicht anders angegeben folgende Quellen verwendet: Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics (Mülhardt, 2013); Zell- und Gewebekultur: Allgemeine und spezielle Anwendungen (Gstraunthaler, 2013).

### **2.2.1 Präparation von humaner genomischer DNA aus Blut**

Für die Klonierung des *FNTB*-F2-Promotors wurde humane genomische DNA als Template benötigt. Diese wurde aus einer humanen Vollblutprobe unter Verwendung des QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, Third Edition, 06/2012) gewonnen. Eluiert wurde in Aqua dest. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

### **2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit der Technik der PCR ist es möglich aus der Gesamtheit des menschlichen Genoms mithilfe eines spezifischen Primerpaares eine gewünschte Sequenz zu amplifizieren. Unter Anwesenheit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten als Substrate, eines hitzestabilen Enzyms, der Taq- oder alternativ der Pfu-Polymerase und unter entsprechenden Pufferbedingungen laufen immer wieder drei gleiche Reaktionen ab, die durch Veränderung der Temperatur mithilfe eines Thermocyclers eingeleitet, aufrechterhalten und wieder beendet werden.

### **Schritt 1: Denaturierung**

Eingeleitet wird die PCR mit dem Schritt der Denaturierung. Dabei werden bei einer Temperatur von 95°C die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden des DNA-Doppelstranges geschmolzen. Der Doppelstrang trennt sich voneinander.

### **Schritt 2: Primerannealing**

Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf eine für jedes Primerpaar spezifische Temperatur abgesenkt, bei der sich diese optimal an den Sense und Antisense Strang der DNA anlagern können. Für jede PCR-Reaktion sind daher immer zwei Primer erforderlich, ein Sense (Se) und ein Antisense (As) Primer. Die optimale Annealingtemperatur muss zuvor in einer Gradienten-PCR ermittelt werden. Hierbei wird im Thermoblock des Thermocyclers ein Temperaturgradient erzeugt, sodass in einem einzigen Lauf gleich mehrere mögliche Annealingtemperaturen ausgetestet werden können. Die Temperatur bei der die deutlichste Produktbande entsteht stellt die optimale Annealingtemperatur dar. Die Annealingtemperaturen, der in dieser Arbeit verwendeten Primer sind Tabelle 4 zu entnehmen.

### **Schritt 3: Elongation**

Nach der Anlagerung der Primer wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der Polymerase gebracht. Die Polymerase beginnt dann den DNA-Strang zu duplizieren. Je nach erwarteter Produktlänge und Eigenschaften des Enzyms dauert dieser Schritt unterschiedlich lange. Die Taq-Polymerase wurde in dieser Arbeit für die Kolonie- und Richtungs-PCR eingesetzt. Ihre Amplifikationsgeschwindigkeit beträgt ca. 1000 Nukleotide pro Minute. Die Pfu-Polymerase wurde aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion und damit geringeren Fehlerrate bei der Amplifikation für die Klonierung der Promotorsequenz und des Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  eingesetzt. Ihre Amplifikationsgeschwindigkeit beträgt ca. 500 Nukleotide pro Minute. Die Elongationszeiten der in dieser Arbeit durchgeführten PCR's sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10: PCR-Protokolle.** Ansätze und Temperaturzyklen der in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen. Die Primersequenzen können Tabelle 4 entnommen werden.

PCR	Ansatz	Temperaturzyklus
Klonierung des <i>FNTB</i> -F2-Promotors	37,5 µl Aqua dest. 5 µl Pfu Puffer mit MgSO <sub>4</sub> 1 µl 10 mM dNTP Mix 2 µl FNTB F2 Se Primer 2 µl FNTB F2 As Primer 0,5 µl Pfu-Polymerase 2 µl DNA-Template, humane genomische DNA (25 ng/µl)	95°C: 3 Min. 95°C: 1 Min. 62°C: 40 Sek. } 36 x 72°C: 4 Min. 72°C: 5 Min.
Kolonie-PCR	15 µl Taq 2 x Master Mix RED (Ampliqon) 1 µl Se Vektorprimer <sup>*3</sup> 1 µl As Vektorprimer <sup>*3</sup> 13 µl Aqua dest. DNA von Zahnstocher (siehe 2.2.8)	95°C: 5 Min. 95°C: 30 Sek. *1°C: 30 Sek. } 35 x 72°C: *2Sek. 72°C: 10 Min.
Richtungs-PCR	15 µl Taq 2 x Master Mix RED (Ampliqon) 1 µl FNTB F2 Se Primer 1 µl pGL4.10 As Primer 12 µl Aqua dest. 1 µl DNA	95°C: 3 Min. 95°C: 1 Min. 62°C: 40 Sek. } 35 x 72°C: *2Sek. 72°C: 5 Min.
Klonierung des HNF1α-Transkriptionsfaktors	37,5 µl Aqua dest. 5 µl Pfu Puffer mit MgSO <sub>4</sub> 1 µl 10 mM dNTP Mix 2 µl HNF1α Se Primer 2 µl HNF1α As Primer 0,5 µl Pfu-Polymerase 2 µl c-DNA-Template HEPG2-Zellen (78 ng/µl)	95°C: 5 Min. 95°C: 30 Sek. 61°C: 30 Sek. } 37 x 72°C: 4 Min. 20 Sek. 72°C: 10 Min.
<sup>*1</sup> Annealingtemperatur abhängig vom verwendeten Primerpaar (siehe Tabelle 4) <sup>*2</sup> Elongationszeit abhängig von der erwarteten Produktlänge (zwischen 50 Sek. und 2 Min. 15 Sek.) <sup>*3</sup> Verwendete Vektorprimer siehe Tabelle 4		

### 2.2.2.1 Kolonie-PCR

Im Rahmen der Klonierung in Vektoren (pGEM-T Easy, pGL4.10 und pcDNA3.1(+)) war die Kolonie-PCR eine erste Maßnahme um zu überprüfen, ob das gewünschte Insert erfolgreich in den jeweiligen Vektor einligiert wurde. Dafür wurde eine PCR-Reaktion mit den entsprechenden Vektorprimern durchgeführt, welche die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors flankierten. Enthielten die Vektoren das gewünschte Insert, war in der anschließenden Gelelektrophorese eine Bande auf der entsprechenden Höhe zu beobachten. Die Elongationszeit wurde je nach erwarteter Produktlänge angepasst. Zur weiteren Verifizierung folgten analytische Verdäue und eine Sequenzierung der Konstrukte.

### 2.2.2.2 Richtungs-PCR

Für die Untersuchung der Promotoraktivität war es essentiell, dass sich die einklonierten Promotorstücke in der korrekten Orientierung im pGL4.10 Vektor befanden (in 5' nach 3' Orientierung vor dem ATG des Luciferasegens des pGL4.10 Vektors). Um dies zu überprüfen wurde eine PCR mit dem pGL4.10 As und *FNTB* F2 Se Primer durchgeführt. Hierbei konnte nur dann ein PCR-Produkt generiert werden, wenn sich die Sequenz in korrekter Orientierung im Vektor befand. Die Elongationszeit wurde je nach erwarteter Produktlänge angepasst.

### 2.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA-Produkten

Die Agarosegelelektrophorese wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um verschiedene DNA-Produkte (PCR-Reaktionsansätze, Restriktionsverdau von Plasmiden) ihrer Größe nach aufzutrennen und durch Vergleich mit entsprechenden mitgeführten DNA-Längenmarkern (Gene Ruler 100 bp Plus, Thermo Scientific; Gene Ruler 1 kb Plus, Thermo Scientific) gezielt die Banden zu identifizieren, die das gewünschte Produkt enthielten. Dafür machte man sich die negative Ladung der DNA, die auf den negativen Ladungen der Phosphatreste beruhte zunutze. In einem horizontal gegossenen Agarosegel wanderten die aufgetragenen DNA-Proben nach Anlegen einer entsprechenden Spannung in Richtung Anode durch das Gel. Je kleiner die DNA-Stücke dabei waren, desto schneller bewegten sie sich durch die Poren des Gels und umgekehrt. Des Weiteren konnte durch Variation der Konzentration der Agarose die Porengröße des Gels verändert werden. Je höherprozentiger dabei das Gel war, desto kleiner waren die Poren und desto langsamer wanderten die DNA-Produkte durch das Gel. In dieser Arbeit wurden für DNA-Produkte zwischen 1000 und 2000 Basenpaaren 1,5 %ige Gele verwendet und für DNA-Produkten kleiner als 1000 Basenpaare 2-2,5 %ige Gele.

Für die Herstellung eines Gels wurde das Agarosepulver (SeaKem LE-Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) entsprechend der gewünschten Agarosekonzentration abgewogen und in 0,5 x TBE-Puffer gegeben. Durch Aufkochen in der Mikrowelle über einige Minuten wurde die Agarose gelöst und danach kurz abgekühlt. Um eine Visualisierung der Banden unter UV-Licht zu ermöglichen, wurde anschließend noch SYBER Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinzugegeben, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die große bzw. kleine Furche der DNA interkaliert. Die Agarose wurde anschließend zum Aushärten in eine



Kammer gegossen. Mittels eines eingesteckten Kamms wurden Taschen für die Proben ausgespart.

Nach 30 Min. waren die Gele ausgehärtet und konnten in eine Elektrophoreselaufkammer mit 0,5 x TBE-Puffer überführt werden. Anschließend wurden die DNA-Proben in die Taschen pipettiert. Bei einer Spannung von 120 V erfolgte die Auftrennung der Proben für ca. 15-20 Min. Die Visualisierung der Banden erfolgte anschließend mittels eines UV-Gel Imagers der Firma INTAS (INTAS, Göttingen, Deutschland).

**Tabelle 11: Zusammensetzung TBE-Puffer 10 x**

Substanz	Konzentration/Menge
Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	20 mM
Aqua dest.	Ad. 500 ml

Für gebrauchsfertigen 0,5 x TBE Puffer wurde 50 ml der 10 x Stocklösung mit 950 ml Aqua dest. verdünnt.

## 2.2.4 DNA-Aufreinigung und Konzentration

Um die DNA aus dem Agarosegel zu extrahieren wurde die entsprechende Bande auf dem UV-Gelbetrachter mittels eines Skalpells ausgeschnitten und dann mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben (Instruction Manual, Version 1.2.0) behandelt. PCR-Reaktionsansätze wurden mit dem DNA Clean & Concentrator TM-5 Kit der Firma Zymo Research gemäß Herstellerangaben (Instruction Manual, Version 1.2.0) aufgereinigt und konzentriert. In beiden Fällen wurde die DNA mit Aqua dest. eluiert und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.2.5 Konzentrationsbestimmung der DNA

Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Proben wurde in dieser Arbeit das ND-1000 Spectrophotometer der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH verwendet. Die Proben wurden mit ultraviolettem Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm

bestrahlt (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren). Anhand der Lichtabsorption der Probe konnte dann deren Konzentration berechnet werden. Zusätzlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und 230 nm (Absorptionsmaximum von Kohlenhydraten und Salze) bestimmt. Durch die Bildung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  konnte die Verunreinigung der Probe mit Proteinen beurteilt werden. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 lag eine weitgehend proteinfreie DNA-Probe vor. Durch die Bildung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{230}$  konnte die Verunreinigung der Probe mit Kohlenhydraten und Salzen beurteilt werden. Ein Wert unter 2,0 deutete dabei auf eine Verunreinigung der Probe hin.

### 2.2.6 5'RACE

Die 5'RACE Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Transkriptionsstartpunkt der *FNTB*-F2-Variante experimentell zu ermitteln. Als Template wurde RNA von A2780-Zellen eingesetzt. Verwendet wurde das SMARTer RACE cDNA Amplification Kit der Firma Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA, USA). In einer ersten Reaktion wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese). Dafür wurde eine spezielle Reverse Transkriptase verwendet. Diese sog. SMARTScribe RT, eine Variante der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) beginnt die Erststrangsynthese am oligo-(dT)-Primer (5'RACE cDNA Synthesis Primer = 5'-CDS Primer A). Der oligo-(dT)-Primer bindet im Bereich des 3'-Endes der RNA am Poly-A-Schwanz. Am Ende der cDNA Synthese fügt die SMARTScribe RT 3-5 Basen, vorwiegend Cytosin, am 3'-Ende der cDNA an. Durch den Einsatz eines weiteren guanosinreichen Primers, der in der Lage ist an diese Sequenz zu binden (SMARTer II Oligonukleotid) kann die SMARTScribe RT von der RNA zum neu synthetisierten cDNA-Strang wechseln und nun diesen als Template benutzen. Dies wird als Template switching bezeichnet, SMART-Technik = switching mechanism at 5'end of RNA transcript, (Chenchik et al., 1996). Auf diese Weise wurde cDNA generiert, die am 5'-Ende über die SMARTer Sequenz verfügte.

In einer 2. Reaktion erfolgte dann die eigentliche Amplifikation des 5'-cDNA Endes (RACE). Dabei wurde unter Einsatz eines genspezifischen Primers (GSP *FNTB* F2 As) der sich im Bereich des 1. Exons der F2-Variante anlagerte und eines weiteren Primers, der sich im Bereich der SMARTer Sequenz anlagerte (Universalprimer, UPM) das 5'-Ende der cDNA amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pGEM-T Easy Vektor (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kloniert. Anschließend wurden die Klone mit den Vektorprimern des pGEM-T Easy Vektors sequenziert. Durch das Computerprogramm MegAlign (DNASTAR Lasergene 10 Core Suite) wurden die Chromatogramme der Klone auf die korrekte Sequenz überprüft und die Länge der amplifizierten 5'-Region ausgewertet.

Die Erststrangsynthese wurde nach Herstellerangaben (SMARTer RACE cDNA Amplification Kit, User Manual, Version No. 011312) mit den im Kit mitgelieferten Reagenzien und Oligonukleotiden durchgeführt. Anschließend wurde die hergestellte RACE-Ready cDNA in Tricine-EDTA Puffer verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die eigentliche 5'RACE-PCR Reaktion wurde abweichend von den Herstellerempfehlungen nach dem Touchdown-PCR-Protokoll von Bachmann et al. (Bachmann et al., 2003) durchgeführt. Bei diesem Protokoll erfolgt zunächst bei 94°C eine initiale Denaturierung der DNA (Schritt 1). Daran schließen sich drei Zyklen aus DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und DNA-Synthese jeweils bei 95°C, 70°C und 72°C an (Schritte 2-10). Anschließend werden die Schritte 2-10 16 mal wiederholt, wobei bei jeder Wiederholung die Temperatur der Primeranlagerung um 1°C abgesenkt wird. Bei der letzten Wiederholung liegt demnach die Temperatur der Primeranlagerung bei 54°C. Es folgt ein weiterer Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und DNA-Synthese jeweils bei 95°C, 58°C und 72°C. Dieser wird 15 mal bei denselben Temperaturen wiederholt. Abschließend erfolgt ein letzter Extensionsschritt bei 72°C für 30 Min. bevor die Proben auf 4°C bis zur Entnahme aus dem Gerät abgekühlt werden (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Protokoll zur 5'RACE PCR**

Ansatz	Temperaturzyklus				
25 µl Taq 2 x Master Mix RED (Ampliqon) 5 µl UPM 10 x (Universalprimer) 1 µl GSP FNTB F2 As 2,5 µl RACE-Ready cDNA 16,5 µl Aqua dest.	1.Schritt	94°C	10 Min.		
	2.Schritt	95°C	30 Sek.		
	3.Schritt	70°C	30 Sek.	minus 1°C	
	4.Schritt	72°C	50 Sek.		
	5.Schritt	95°C	30 Sek.		
	6.Schritt	70°C	30 Sek.	minus 1°C	
	7.Schritt	72°C	50 Sek.		
	8.Schritt	95°C	30 Sek.		
	9.Schritt	70°C	30 Sek.	minus 1°C	
	10.Schritt	72°C	50 Sek.		Schritt 2-10 x16
	11.Schritt	95°C	30 Sek.		
	12.Schritt	58°C	30 Sek.		
	13.Schritt	72°C	50 Sek.		Schritt 11-13 x15
	14.Schritt	72°C	30 Min.		
	15.Schritt	4°C	10 h		

## 2.2.7 Arbeiten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die in der Lage sind bestimmte palindromische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu schneiden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um DNA-Abschnitte in Vektoren zu klonieren (siehe 2.2.8) und für analytische Verdäue. Für die Planung eines Restriktionsverdaus wurden die Programme NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) und Double Digest Finder (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>) benutzt. Die Auswahl der entsprechenden Reaktionspuffer erfolgte nach Herstellerangaben. Abschnitt 2.1.3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde 6 x Orange Loading Dye (Fermentas) zugegeben.

### 2.2.7.1 Analytischer Verdau

Um die Orientierung eines ligierten Inserts im Vektor zu überprüfen wurden zwei Restriktionsenzyme ausgewählt von denen eines seine Schnittstelle innerhalb des Inserts und das anderen seine Schnittstelle innerhalb der Vektorsequenz hatte. Je nach Orientierung des ligierten Inserts resultieren im Doppelverdau unterschiedlich lange Schnittprodukte.

## 2.2.8 Klonierung

### 2.2.8.1 Klonierung des *FNTB-F2*-Promotors in den pGEM-T Easy Vektor

Mittels PCR wurde eine 1985 bp lange Sequenz (aus NCBI Referenz Sequenz: NC\_000014.9, Position: 64988059 - 64990043) amplifiziert (PCR-Bedingungen siehe Tabelle 10), gelelektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben (Technical Manual, pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, TM042) kloniert. Der Vektor ist bereits linearisiert und verfügt an beiden Enden über ein Thymidin. Dieses soll zum einen eine Religation des Vektors verhindern und zum anderen das Klonieren eines PCR-Fragmentes mit Adenin am 3'-Ende erleichtern. Daher musste das PCR-Produkt, welches mittels Pfu-Polymerase erstellt wurde, zunächst noch einem A-Tailing unterzogen werden. Hierbei wurde durch die Taq-Polymerase am 3'-Ende ein Adenin an die PCR-Produkte angefügt. Anschließend erfolgte die Ligation in den pGEM-T Easy Vektor.

**Tabelle 13: Ansätze für die Klonierung in den pGEM-T Easy Vektor**

A-Tailing	Ligation in den pGEM-T Easy Vektor
6,4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt 1 µl dATP (2mM) 1 µl Taq-Polymerase (5 u/µl) 0,6 µl MgCl <sub>2</sub> 1 µl 10 x Reaktionspuffer  Bei 70°C für 30 Min. inkubiert.	1 µl pGEM-T Easy Vektor (50 ng/µl) 100 ng DNA-Insert (Molares Vektor/Insert Verhältnis von 1:3) 5 µl 2 x Reaktionspuffer 1 µl T4 Ligase (3 u/µl) Ad. 10 µl mit Aqua dest.  Bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend für 5 Min. bei 70 °C inkubiert zum abstoppen der Reaktion.

### 2.2.8.2 Umklonierung in den pGL4.10 Vektor und Erstellung der Deletionskonstrukte

Durch den Einsatz verschiedener Restriktionsenzyme konnten unterschiedliche Abschnitte dieser Sequenz aus dem pGEM-T Easy Vektor herausgeschnitten werden und diese dann in den eigentlichen Reportergenvektor, den pGL4.10 Vektor, umkloniert werden. Zur Vorbereitung wurde der pGL4.10 Vektor mittels *EcoRV* aufgeschnitten und dephosphoryliert (siehe Tabelle 14). Die aus dem pGEM-T Easy Vektor ausgeschnittenen Promotorfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und

aufgereinigt. Durch das Klenow Fragment wurden ggf. entstehende überhängende DNA-Abschnitte, sog. sticky ends (je nach verwendeten Enzymen) aufgefüllt, um DNA-Enden ohne Überhang, sog. blunt ends zu erhalten. Anschließend erfolgte die Ligation in den pGL4.10 Vektor und die Transformation in ultrakompetente Zellen. Es wurden drei Arten von Promotorkonstrukten erstellt.

**Tabelle 14: Ansätze für die Umklonierung in den pGL4.10 Vektor**

<p><b>pGL4.10 Vektor mit <i>EcoRV</i> aufschneiden</b></p> <p>5 µg pGL4.10 Vektor  2 µl <i>EcoRV</i> (10 u/µl)  5 µl 10 x Puffer Red mit BSA  Ad. 50 µl mit Aqua dest.</p> <p>Bei 37 °C über Nacht inkubiert.</p>	<p><b>Dephosphorylierung des pGL4.10 Vektors</b></p> <p>1 µl Fast AP (1 u/µl) zum Restriktionsansatz dazugeben, 10 Min. bei 37°C inkubiert.</p>
<p><b>Auffüllreaktion mit Klenow</b></p> <p>4 µg DNA in Aqua dest.  2 µl 10 x Reaktionspuffer  0,5 µl dNTP (2mM)  0,5 µl Klenow Fragment (10 u/µl)  Ad. 20 µl mit Aqua dest.</p> <p>10 Min. bei 37°C, anschließend 10 Min. bei 70°C um Reaktion zu stoppen.</p>	<p><b>Ligation in pGL4.10 Vektor</b></p> <p>1 µl pGL4.10 Vektor (50 ng/µl)  x µl DNA-Insert (Molare Vektor/Insert Verhältnisse von 1:1 bis 1:3)  2 µl PEG 4000 Solution  1 µl T4 Ligase (5 u/µl)  2 µl 10 x Puffer T4 Ligase  Ad. 20 µl mit Aqua dest.</p> <p>Bei Raumtemperatur für 6 h inkubiert.  Anschließend für 5 Min. bei 70 °C inkubiert zum abstoppen der Reaktion.</p>

### 5'-Deletionskonstrukte mit Translationsstartpunkt

Es wurden insgesamt sieben Promotorkonstrukte erstellt, die im Bereich des 3'-Endes noch den Translationsstartpunkt ATG der *FNTB-F2*-Variante mit beinhalteten. Dafür wurden jeweils Doppelverdauungen des pGEM-T Easy Vektors durchgeführt, wobei immer auch das Enzym *AclI* mit verwendet wurde. *AclI* hatte seine Schnittstelle am 3'-Ende der Promotorsequenz, 8 bp in 3'-Richtung des Translationsstartpunktes. Durch die Kombination mit jeweils einem weiteren Enzym, welches seine Schnittstelle am 5'-Ende der Promotorsequenz hatte, konnten demnach Konstrukte erstellt werden, die am 3'-Ende immer gleich waren, am 5'-Ende jedoch kürzer wurden. Abweichend davon musste bei den Konstrukten -1381/+8 und -307/+8 eine andere Strategie gewählt werden, da es nicht möglich war, die gewünschte Produktbande durch Gelelektrophorese von den anderen

ungewünschten Banden ausreichend zu separieren (aufgrund sehr ähnlicher Größen der Schnittprodukte aus dem Doppelverdau). In diesen Fällen wurde zunächst das Gesamtpromotorkonstrukt mittels *NotI* und *AclI* aus dem pGEM-T Easy Vektor ausgeschnitten und dieses dann in einem Einzelverdau mit den entsprechenden Enzymen (*MscI* bzw. *SmlI*) weiter bearbeitet. Abbildung 3A gibt einen Überblick über die erstellen 5'-Deletionskonstrukte mit ATG.

### 5'-Deletionskonstrukte ohne Translationsstartpunkt

Es wurden insgesamt sieben Promotorkonstrukte erstellt, die im Bereich des 3'-Endes den Translationsstartpunkt ATG der *FNTB-F2*-Variante nicht mehr beinhalteten. Dafür wurde nach dem gleichen Prinzip vorgegangen wie bei der Erstellung der Konstrukte mit Translationsstartpunkt. Anstelle von *AclI* wurde *PciI* verwendet. Dieses Enzym hatte seine Schnittstelle 23 bp in 5'-Richtung ausgehend vom Translationsstartpunkt ATG. Die restlichen Enzyme waren identisch. Auch hier musste bei 2 Konstrukten (-1830/-23 und -307/-23) aus den gleichen Gründen wie oben eine andere Strategie gewählt werden. Es wurde zunächst das Gesamtkonstrukt mittels *NotI* und *PciI* aus dem pGEM-T Easy Vektor ausgeschnitten und dieses dann in einem Einzelverdau mit den entsprechenden Enzymen (*SspI* bzw. *SmlI*) weiter bearbeitet. Abbildung 3B gibt einen Überblick über die erstellten 5'-Deletionskonstrukte ohne ATG.

**Tabelle 15: Restriktionsverdaue für die Erstellung der 5'-Deletionskonstrukte**

Doppelverdau des pGEM-T Easy Vektors	Einzelverdau des herausgeschnittenen Inserts
5 µg pGEM-T Easy Vektor 25 u <i>AclI</i> oder <i>PciI</i> 25 u Enzym 2 <sup>*1</sup> 5 µl Reaktionspuffer 0,5 µl BSA 100 x <sup>*2</sup> 1 µl SAM 50 x (0,5 mM) <sup>*2</sup> Ad. 50 µl mit Aqua dest.  Inkubation bei 37°C (Ausnahme: <i>SmlI</i> bei 55°C) über Nacht.	1,2 – 2 µg DNA 10 u <i>SspI</i> , <i>SmlI</i> oder <i>MscI</i> 5 µl Reaktionspuffer Ad. 50 µl mit Aqua dest.  Inkubation bei 37°C über Nacht.
<sup>*1</sup> Eines der Enzyme, die am 5'-Ende der einklonierten Promotorsequenz schneidet. <sup>*2</sup> Fakultativ, je nach verwendeten Enzym.	

### 3'-Deletionskonstrukt

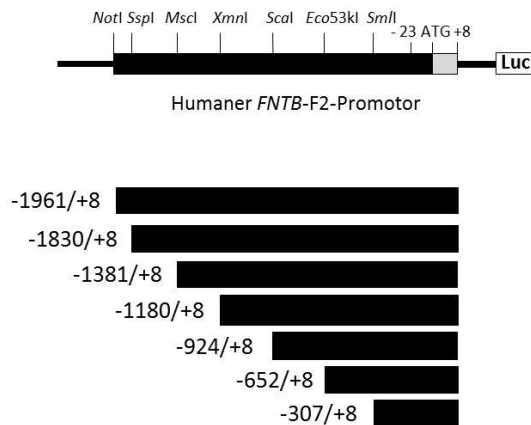
Zusätzlich zu den 5'-Deletionskonstrukten wurde auch ein Promotorkonstrukt erstellt, welches am 3'-Ende eine Deletion aufwies (siehe Abbildung 3C). Dafür wurde zunächst ein Doppelverdau des -1961/+8 Konstrukts im pGL4.10 Vektor mit den Enzymen *SphI* und *BglII* durchgeführt. Dadurch wurde eine 717 bp lange Sequenz im 3'-Bereich des Promotorkonstrukts herausgeschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Extraktion des nun aufgeschnittenen Vektors, wurden die überhängenden Vektorenden mittels Klenow Reaktion aufgefüllt und der Vektor anschließend wieder religiert. Es folgte die Transformation in ultrakompetente Zellen.

**Tabelle 16: Restriktionsverdaue für die Erstellung des 3'-Deletionskonstrukts**

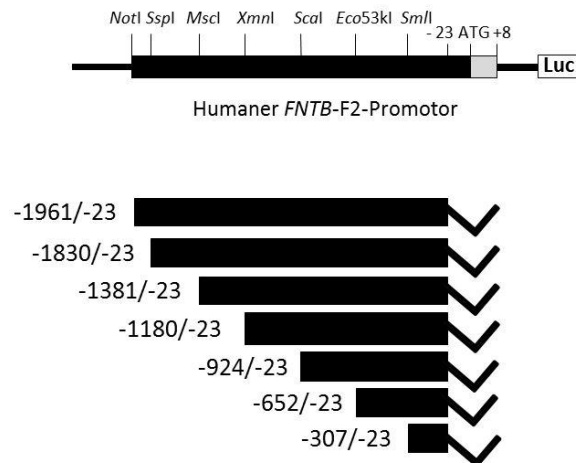
Doppelverdau des -1961/+8 Konstrukts im pGL4.10 Vektor	Religation des pGL4.10 Vektors
5 µg -1961/+8 Konstrukt im pGL4.10 Vektor 25 u <i>SphI</i> 25 u <i>BglII</i> 5 µl NEB Puffer 3.1 Ad. 50 µl mit Aqua dest.  Inkubation bei 37°C über Nacht.	60 ng aufgeschnittener Vektor 2 µl 10 x Puffer T4 Ligase 2 µl PEG 4000 5 µl T4 Ligase (5 u/µl) Ad. 20 µl mit Aqua dest.  Inkubation bei 37°C über Nacht.



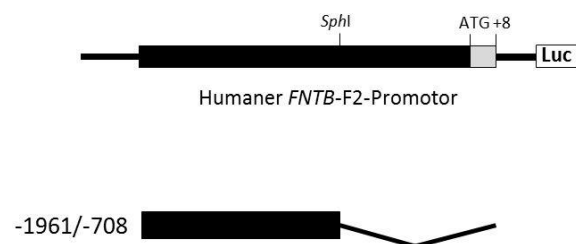
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 3: Überblick über die erstellten Deletionskonstrukte.** Dargestellt sind die 5'-Deletionskonstrukte mit (A) und ohne (B) Translationsstartpunkt sowie das 3-Deletionskonstrukt. Darüber ist jeweils schematisch der *FNTB*-F2-Promotor abgebildet inklusive der Lage der Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme mithilfe derer die Konstrukte erstellt wurden. Die Nummerierung der Konstrukte bezieht sich auf das Adenin des Translationsstartpunkts (A = +1).

### 2.2.8.3 Transformation in kompetente DH5 $\alpha$ Zellen

Bei der Transformation von *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen erfolgt das Einbringen von Plasmid-DNA in die Bakterienzellen. Die aufgenommene Plasmid-DNA wird durch die Bakterien vervielfältigt. Es wurden kompetente DH5 $\alpha$  *E.coli* (Genotyp: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZ*YA-*argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ <sup>-</sup>) von der Firma Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA) verwendet. Bis zur Verwendung wurden die Bakterien in Aliquots zu 20  $\mu$ l bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden die Bakterien zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurde 1  $\mu$ l des 4°C kalten Ligationsmixes zu den Bakterien gegeben und für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 40 Sek. wodurch die Bakterien die Plasmide aufnahmen. Danach 2 Min. Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 80  $\mu$ l SOC Medium (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA) wurde für 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend die gesamten 100  $\mu$ l auf eine LB-Agarplatte (+ Ampicillin, + X-Gal, siehe 2.1.5.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.8.4 Transformation in ultrakompetente Zellen

Für die Umklonierung in den pGL4.10 Vektor wurden ultrakompetente *E.coli* (XL10-Gold Ultracompetent Cells, Genotyp: Tet<sup>r</sup> $\Delta$ (*mcrA*) 183 $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F<sup>'</sup> *proAB lac*<sup>f</sup> $\Delta$ M15 Tn 10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]) der Firma Stratagene verwendet. 45  $\mu$ l Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und dann 2  $\mu$ l  $\beta$ -ME zugegeben, geschüttelt und für 10 Min. inkubiert. Alle 2 Min. wurde der Ansatz erneut geschüttelt. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurde für 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sek. und eine anschließende Inkubation für 2 Min. auf Eis. Nach Zugabe von 0,5 ml 42°C warmer NZY<sup>+</sup> Broth (siehe 2.1.5.2) wurde für 1 h bei 37°C unter schüttelt inkubiert. Es wurden 250  $\mu$ l auf eine LB-Agarplatte (+ Ampicillin, siehe 2.1.5.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.8.5 Ampicillin und blau/weiß Selektion

Der pGEM-T Easy Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Durch den Zusatz von Ampicillin zum LB-Nährmedium konnten daher nur Bakterienzellen auf den Agarplatten wachsen, welche erfolgreich ein Plasmid aufgenommen hatten. Zur weiteren Selektionierung, ob dieses Plasmid auch ein Insert enthielt, diente die blau-weiß Selektionierung. Der pGEM-T Easy Vektor verfügt dafür über ein *lacZ*-Gen innerhalb der

MCS. Ligierte leere Vektoren exprimierten das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Dieses spaltet das ebenfalls im Nährmedium zugesetzte Galaktosid X-Gal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Blaue Bakterienkolonien enthielten demnach nur leere Vektoren. Durch erfolgreiches ligieren eines Inserts in den Vektor wurde das *lacZ*-Gen unterbrochen. Folglich blieben die Bakterienkolonien weiß. Weiße Bakterienkolonien wurden für weitere Analysen per sterilisiertem Zahnstocher auf eine Sicherungsplatte übertragen. Die Sicherungsplatte war eine herkömmliche LB-Agarplatte (+ Ampicillin, + X-Gal, siehe 2.1.5.1), auf der jedoch mittels eines aufgelegten Rasters analysierte Bakterienkolonien leichter wiedergefunden werden konnten.

Der pGL4.10 Vektor verfügt zwar auch über ein Ampicillin-Resistenz-Gen, allerdings über kein *lacZ*-Gen, wodurch hier keine blau/weiß Selektion möglich war. Daher wurden hier jeweils 10-20 Kolonien per Zahnstocher auf eine Sicherungsplatte übertragen und weiter analysiert. Auf der Sicherungsplatte wurden die Kolonien für 6 h bei 37°C bebrütet. In dieser Zeit wurden Kolonie-PCR's durchgeführt (siehe 2.2.2.1). Positive Kolonien wurden anschließend von der Sicherungsplatte in 5 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C unter schütteln inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Vervielfältigung der Plasmid-DNA durch die Bakterien. Anschließend wurde Plasmid-DNA gewonnen (siehe 2.2.9).

### **2.2.8.6 Weitere Selektionierung bei den 5'-Deletionskonstrukten**

Bei der Erstellung der 5'-Deletionskonstrukte war es entscheidend, dass die ligierten Promotorkonstrukte in 5'-nach 3'-Richtung vor dem Luciferase-Reportergen einligiert wurden. Da die Ligation in den pGL4.10 Vektor jedoch ohne überhängende Vektorenden erfolgte, musste anschließend noch die korrekte Orientierung der ligierten Konstrukte überprüft werden. Bei den Konstrukten -1961/+8 und -1961/-23 konnte dies mittels Richtungs-PCR (siehe 2.2.2.2) erfolgen, da diese beiden Konstrukte noch die Primersequenz für den *FNTB* F2 Se Primer beinhalteten. Alle anderen 5'-Deletionskonstrukte enthielten diese Primersequenz wegen der Verkürzung am 5'-Ende nicht mehr, sodass hier keine Richtungs-PCR durchgeführt werden konnte. Alternativ wurde bei diesen Konstrukten nach positivem Ausfall der Kolonie-PCR (siehe 2.2.2.1) und Präparation von Plasmid-DNA ein analytischer Verdau durchgeführt (siehe 2.2.7.1). Dafür wurden jeweils 0,5  $\mu$ g des Konstrukts, durch 5 u eines geeigneten Restriktionsenzym (Tabelle 17) und 3  $\mu$ l eines geeigneten 10 x Reaktionspuffers, in einem finalen Volumen von 30  $\mu$ l bei 37°C über Nacht verdaut.

**Tabelle 17: Enzyme für analytische Verdauung der 5'-Deletionskonstrukte**

Enzym für den analytischen Verdau	5'-Deletionskonstrukt
<i>SacI</i>	-1830/+8; -1830/-23; -924/+8; -924/-23
<i>SpeI</i>	-1381/+8; -1381/-23; -1180/+8; -1180/-23
<i>BspMI</i>	-652/+8; -652/-23
<i>A/IwNI</i>	-307/+8; -307/-23

#### 2.2.8.7 Erstellung eines HNF1 $\alpha$ -Expressionsplasmids

Mittels PCR wurde eine 1896 bp lange Sequenz (NCBI Referenz Sequenz: NM\_000545.6), die für den Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  kodiert, amplifiziert (PCR-Bedingungen siehe Tabelle 10) und in den pGEM-T Easy Vektor inkloniert. Als Template für die PCR-Reaktion wurde cDNA von HEPG2-Zellen verwendet. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den eigentlichen Expressionsvektor, den pcDNA3.1(+) Vektor. Dafür wurde der Vektor zunächst mittels *EcoRI* FD aufgeschnitten und dephosphoryliert. Das Insert wurde ebenfalls mittels *EcoRI* FD aus dem pGEM-T Easy Vektor herausgeschnitten und dann in einem molaren Vektor/Insert Verhältnis von 1:3 in den pcDNA3.1(+) Expressionsvektor ligiert. Die Transformation erfolgte in ultrakompetente *E. coli* Zellen. Um die korrekte Orientierung des Inserts im Vektor zu überprüfen, wurden die Enzyme *HindIII* und *BbvCI* verwendet. Der erstellte Vektor erhielt die Bezeichnung pcDNA3.1\_HNF1 $\alpha$ .

#### 2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Kits gewonnen. Für analytische Verdauung und für die Sequenzierung wurde eine Miniprep nach Herstellerangaben (QIAprep Miniprep Handbook, Fourth Edition, 06/2015) durchgeführt (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Um größere Mengen Plasmid-DNA für den Einsatz in den Reporterassays zu erhalten wurde eine Midiprep nach Herstellerangaben (QIAfilter Plasmid Purification Handbook, Third Edition, 11/2005) durchgeführt (QIAfilter<sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Eluiert wurde mithilfe des mitgelieferten Elutionspuffers (Elution buffer) aus dem Kit. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

## **2.2.10 DNA-Sequenzierung**

Vor der eigentlichen Verwendung der erstellten Deletionskonstrukte und des HNF1 $\alpha$ -Überexpressionsplasmids wurden diese durch die Firma GATC Biotech, Köln, Deutschland sequenziert. Zur Analyse der Chromatogramme wurde das Computerprogramm MegAlign benutzt.

## **2.2.11 Zellkultur**

### **2.2.11.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Gearbeitet wurde unter einer Sicherheitswerkbank. Vor Arbeitsbeginn und nach Beendigung der Arbeiten wurden alle Flächen mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Sämtliche Verbrauchsmaterialien wurden entweder steril der Verpackung entnommen oder durch Autoklavieren sterilisiert (z.B. Glaspipetten). Kultiviert wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 80-90 %.

In dieser Arbeit wurden drei humane immortalisierte Zelllinien verwendet. Eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK-293), eine Ovarialkarzinomzelllinie (A2780) und eine Leberzellkarzinomzelllinie (HEPG2). HEK-293-Zellen wurden in DMEM Medium kultiviert. A2780-Zellen wurden in einer Mischung aus 1/3 DMEM und 2/3 RPMI Medium kultiviert und HEPG2-Zellen wurden in RPMI Medium kultiviert. Alle Medien wurden vor ihrem Gebrauch steril filtriert. Zudem wurden allen Medien 10 % FKS als Wachstumsfaktorquelle und 1 % Penizillin/Streptomycin gegen bakterielle Verkeimung zugesetzt.

### **2.2.11.2 Splitten und Subkultur**

Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurde bei HEK-293-Zellen das Zellkulturmedium mittels Glaspipette bis auf einen kleinen Rest von 3-4 ml abgesaugt. Mittels einer Pipette wurden nun die Zellen mit dem verbliebenen Medium vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und ausgiebig durchmischt, um eine Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Bei A2780- und HEPG2-Zellen wurde abweichend

davon das komplette Medium abgesaugt und anschließend 4 ml 37°C warmes Trypsin-EDTA hinzugegeben und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden auch hier die Zellen mittels Pipette ausgiebig durchmischt. Diese Zellsuspension wurde anschließend zu 90 % abgesaugt und 20 ml frisches Medium hinzugegeben. Für eine Subkultur wurden 10 Tropfen der Zellsuspension in eine 2. Kulturflasche mit frischem Medium überführt.

### 2.2.12 Gewinnung von Ganzzelllysaten

In dieser Arbeit wurde im Rahmen eines Zeitreihenexperiments (siehe 2.2.15.1) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der Zellen Ganzzelllysate gewonnen. Dafür wurde das Zellmedium komplett abgesaugt und mit 3 ml DPBS die Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst und suspendiert. Es folgten 2 Waschschrte mit DPBS um Reste des Kulturmediums zu beseitigen. Anschließend wurden 200 µl RIPA-Puffer zugegeben, bei 4°C für 15 Min. geschüttelt und für 15 Min. bei 4°C bei 13.000 rpm (10400xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, rasch in flüssigem Stickstoff gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

**Tabelle 18: Zusammensetzung des RIPA-Puffers**

Substanz	Menge/Konzentration
Complete Protease Inhibitor (Roche)	1 Tablette
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Natriumdesoxycholat	0,25 %
EDTA	1 mM
Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4	50 mM
Aqua dest.	Ad. 100 ml

### 2.2.13 Gewinnung von Zellkernextrakten

Für EMSAs wurden Zellkernextrakte benötigt, da sich nur dort die für die Untersuchung notwendigen Transkriptionsfaktoren in ausreichender Menge befinden. Es wurde das NuCLEAR™ extraction kit (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) verwendet.

Zunächst wurde der Lysis- und Extraktionspuffer wie in unten stehender Tabelle aufgeführt mit den im Kit mitgelieferten Reagenzien gemischt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

**Tabelle 19: Puffer für die Gewinnung von Zellkernextrakten**

Puffer	Reagenzien	Menge
Lysis-Puffer (Hypoton)	10 x Hypotonic Lysis Puffer	50 µl
	DTT 0,1 M	5 µl
	Protease Inhibitor Cocktail	5 µl
	Aqua dest.	450 µl
Extraktions-Puffer	Extraktionspuffer	98 µl
	DTT 0,1 M	1 µl
	Protease Inhibitor Cocktail	1 µl

Das Zellmedium wurde vollständig abgesaugt. Mit 3 ml DPBS wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und durchmischt. Es folgten zwei Waschschrirte mit DPBS, um verbliebene Reste des Kulturmediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen bei 1600 rpm (450xg) für 5 Min. zentrifugiert und dann das Zellpackvolumen bestimmt. Nach Zusatz der 5-fachen Menge an Lysis-Puffer wurde der Ansatz für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde Igepal 10 % in einem Verhältnis 6 µl Igepal/100 µl Lysis-Puffer-Mischung zugegeben. Es wurde 10 Sek. gevortext und anschließend 30 Sek. bei 13000 rpm (10400xg) zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Zellen lysiert. Die Zellkerne blieben jedoch erhalten und bildeten das Pellet. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen (Zytoplasmafraktion). Das Pellet wurde mittels Extraktionspuffer resuspendiert (2/3 des Zellpackvolumens), für 30 Min. geschüttelt und anschließend für 15 Min. bei 13000 rpm (10400xg) zentrifugiert. Die Zellkernfraktion bildete nun den Überstand. Dieser wurde abpipettiert, in flüssigem Stickstoff rasch abgekühlt und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Ganzzelllysate (siehe 2.2.12) und Zellkernextrakte (siehe 2.2.13) wurde in dieser Arbeit das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Dabei wurden in einer ersten Reaktion  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen an den Proteinen der Lösung zu  $\text{Cu}^+$  Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). In einer zweiten Reaktion bildeten sich aus diesen  $\text{Cu}^+$  Ionen und dem Chelatbildner Bicinchoninsäure (BCA) violette Farbkomplexe. Die Absorption dieser Lösung verhielt sich dabei proportional zur

Menge an vorhandenem Protein. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (Instructions Pierce BCA Protein Assay Kit, 1296.11). Dafür wurden jeweils 25 µl der Proteinproben und der im Kit enthaltenen Albumin Standardreihe mit 500 µl der Arbeitslösung aus dem Kit versetzt (Pierce Lösung A + B, im Mischungsverhältnis 50:1, wurde vor jeder Proteinbestimmung frisch angesetzt). Anschließend wurde bei 37°C für 30 Min. inkubiert. Danach wurde bei 562 nm im Photometer die Absorption gemessen und mit Hilfe der Albumin Standardreihe aus dem Kit die Proteinkonzentration errechnet.

## **2.2.15 Validierung des Überexpressionsplasmids**

### **2.2.15.1 Transfektion von HEK-293-Zellen (Zeitreihe)**

Das in dieser Arbeit selbst hergestellte Überexpressionsplasmid pcDNA3.1\_HNF1α (siehe 2.2.8.7) wurde in HEK-293-Zellen transfiziert und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten Ganzzelllysate (siehe 2.2.12) gewonnen. Diese wurden dann im Western Blot (siehe 2.2.15.2) auf die Expression des Proteins untersucht. Am Tag vor der Transfektion wurden 500.000 HEK-293-Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Platte in antibiotikafreiem DMEM Medium mit 10 % FKS ausgesät. Für die Transfektion wurden 4 µg pcDNA3.1\_HNF1α-Überexpressionsvektor bzw. 4 µg pcDNA3.1 Leervektor in 250 µl Opti-MEM Medium verdünnt. Ebenfalls wurde 10 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 in 240 µl Opti-MEM Medium verdünnt und für 5 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und nochmals für 20 Min. inkubiert. Der Gesamtansatz von 500 µl wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 2, 4, 8, 16 bzw. 24 h bei 37°C inkubiert. Es wurden 3 voneinander unabhängige Wiederholungen des Experiments durchgeführt.

### **2.2.15.2 Western Blot**

Der Western Blot dient dazu Proteine aus einem Proteingemisch spezifisch nachzuweisen. Dafür wird die Proteinmischung zunächst mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (geblottet). Es folgt die Nachweisreaktion, die in dieser Arbeit mittels Antikörperreaktion (Immundetektion) durchgeführt wurde.



## **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte in dieser Arbeit mittels SDS-PAGE. Das Polyacrylamid dient dabei als molekulares Sieb. Die Porengröße wird durch den prozentualen Anteil des Acrylamids bestimmt. Das SDS, ein anionisches Detergenz denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine negative Gesamtladung. Folglich erfolgt die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von ihrer Ladung. Zum Gießen der Gele wurde in dieser Arbeit das Mini-Protean 2D Elektrophoresesystem der Firma Biorad verwendet. Es wurden 2 Glasplatten, eine davon mit Abstandshalter und ein Gestell aufgebaut und dann das Gel oben zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Ein eingesteckter Kamm oben in das Sammelgel diente der Aussparung der Lauftaschen. Es wurde zunächst ein 10%iges Polyacrylamidgel als Trenngel gegossen. Anschließend wurde das Gel mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, da dieses nur unter Luftabschluss auspolymerisierte. Es folgte das Gießen des Sammelgels auf das Trenngel. Die Proben wurden mit 3x Lämmli und Aqua dest. verdünnt und für 3 Min. bei 98°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt auf das Gel aufgetragen (20 µg Proteingemisch pro Tasche). Bei einer Stromstärke von 30 mA pro Gel wurde das Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Laufront der Proteine das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

## **Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel und die Laufront der Proteine vom Trenngel abgetrennt. Für den Transfer der Proteine vom Trenngel auf die Nitrocellulosemembran wurden zunächst die Membran und das Blotting-Filterpapier für 10 Min. in Transferpuffer getränkt. Der Blot erfolgte in Semidry-Technik in einer Transferapparatur der Firma Biorad (Trans-Blot SD). Zwischen zwei Metallplatten, von denen die obere als Kathode und die untere als Anode fungierte, wurden folgende Schichten von oben nach unten aufgebaut: 2 Lagen Blotting-Filterpapier, das Polyacrylamidgel, die Nitrocellulosemembran, 2 Lagen Blotting-Filterpapier. Durch das Anlegen einer Spannung von 15 V für 30 Min. wanderten die anionischen Proteine in vertikaler Richtung vom Gel auf die Nitrocellulosemembran in Richtung der Anode. Nach dem Blot wurde die Membran für 3 Min. in DPBS gewaschen.

## Nachweis der Proteine durch Antikörperreaktion

In einem ersten Schritt wurde die Membran für 1 h in Blockinglösung inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Für die Detektion der HNF1 $\alpha$ -Proteinbande wurden 2 Antikörper verwendet. Ein erster Primärantikörper bindet spezifisch das HNF1 $\alpha$ -Protein auf der Membran. Für die Nachweisreaktion dieser Antigen-Antikörper Bindung wurde anschließend ein Sekundärantikörper zugesetzt. Dieser bindet an den Erstantikörper. Es können mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, was zur Signalverstärkung führt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Infrarotfarbstoff gekoppelt. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten immer wieder Waschschrte in DPBS nach folgendem Protokoll.

**Tabelle 20: Protokoll Proteindetektion durch Immunreaktion**

Waschen	1 x DPBS
Blocking	1 h in LI-COR Odyssey Blocking Buffer PBS
1.Antikörper	über Nacht bei 4°C auf Schüttler, Antikörper 1:1.000 verdünnt in LI-COR Odyssey Blocking Buffer PBS und 0,2 % Tween20
Waschen	4 x DPBS + 0,1 % Tween20 jeweils für 5 Min. auf Schüttler bei RT
2.Antikörper	1 h bei RT auf Schüttler, Antikörper (Goat anti-rabbit) 1:10.000 verdünnt in LI-COR Odyssey Blocking Buffer PBS und 0,2 % Tween20
Waschen	3 x DPBS + 0,1 % Tween20 jeweils für 5 Min. auf Schüttler bei RT
Waschen	1 x DPBS für 5 Min. auf Schüttler bei RT

Für die Visualisierung wurde die Membran auf dem Odyssey infrarot Fluoreszenzscanner eingescannt. Bei 800 nm fluoreszieren die markierten Sekundärantikörper grün. Durch den Vergleich mit einem mitgeführten Proteingrößenstandard konnte zudem das Molekulargewicht der Proteinbanden bestimmt werden. Das erwartete Gewicht des nachzuweisenden HNF1 $\alpha$ -Proteins lag bei 79 kDa.

**Tabelle 21: Gele für den Western Blot**

<b>Gel</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Trenngel (10%ig)	Trenngel-Puffer (Tris-HCL 3 M)	0,94 ml
	Acrylamid (29:1)	1,9 ml
	SDS 10 %	75 µl
	APS 10 %	75 µl
	TEMED	75 µl
	Aqua dest.	4,55 ml
Sammelgel	Sammelgel-Puffer (Tris-HCL 0,5 M)	625 µl
	Acrylamid (29:1)	640 µl
	SDS 10 %	50 µl
	APS 10 %	50 µl
	TEMED	5 µl
	Aqua dest.	3,64 ml

**Tabelle 22: Puffer für den Western Blot**

<b>Name</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge/Konzentration</b>
Elektrophorese-Puffer, 1 x	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	3,5 mM
	Aqua dest.	Ad. 1 l
Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	190 mM
	Methanol	20 %
	Aqua dest.	Ad. 1 l
3-fach Lämmli	SDS 20 %	3 ml
	Glycerol	3 ml
	Tris 1 M pH 6,8	1,8 ml
	β-ME	300 µl
	Bromphenolblau	1 kl. Spatelspitze
	Aqua dest.	2,2 ml

## 2.2.16 Reportergenassay

Mittels des Luciferase Reportergen Assays kann die Promotoraktivität eines DNA-Abschnitts bestimmt werden. Beim Luciferase Assay System werden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte in den Reportergenvektor pGL4.10 einkloniert. Dieser Vektor besitzt in 3'-Richtung ausgehend von der MCS das *luc2* Gen welches für das Enzym Firefly-Luciferase kodiert. Je nach Promotoraktivität des einklonierten Konstruktes wird das Enzym unterschiedlich stark exprimiert. Nach Zusatz von Beetle Luciferin als Substrat wird dieses von der Luciferase umgesetzt. Dabei wird Licht abgegeben. Diese Biolumineszenz wird gemessen. Die emittierte Lichtmenge ist dabei proportional zur

Expression des Enzyms, wodurch wiederum auf die Aktivität des einklonierten Promotorkonstrukts geschlossen werden kann. Ohne einkloniertes Promotorkonstrukt dient der Vektor als Negativkontrolle (Leerwert), da er selbst keine Promotorelemente besitzt. Gleichzeitig wird bei jeder Transfektion der pGL4.74 Vektor ko-transfiziert. Dieser Vektor beinhaltet das Gen *hRluc*, welches für das Enzym Renilla reniformis (Renilla-Luciferase) kodiert. Das Gen steht unter regulatorischer Kontrolle des HSV-TK Promoters, wodurch nach Transfektion eine kontinuierliche Expression des Enzyms gewährleistet ist. Dadurch können durch die Messung der Renillaaktivität Rückschlüsse auf die Transfektionseffizienz gezogen werden. Die Messung der Firefly- und Renillaaktivität erfolgte nacheinander. Durch die Verwendung unterschiedlicher Substrate (siehe unten) und eines Inhibitors der Firefly-Luciferase vor Beginn der 2. Messung können die Aktivitäten der beiden Enzyme bei den Messungen voneinander unterschieden werden.

### 2.2.16.1 Transiente Transfektion von HEK-293-, A2780- und HEPG2-Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf eine 96-Loch Platte ausgesät. Zuvor wurde das jeweilige Kulturmedium gegen frisches antibiotikafreies Medium ausgetauscht. Die Zellen sollten bei der Transfektion eine Konfluenz von 60-70 % aufweisen. Die Zellen wurden chemisch transfiziert. Die Transfektion erfolgte dabei nach folgendem Schema (siehe Tabelle 23).

**Tabelle 23: Transfektionsprotokoll für den Reportergenassay**

	<b>HEK-293</b>	<b>A2780</b>	<b>HEPG2</b>
Ausgesäte Zellzahl/100 µl/Loch	15.000	25.000	18.000
Inkubation über Nacht			
5'-Deletions- konstrukte in pGL4.10 Vektor	175 ng bzw. 43,75 ng bei Überexpressionsversuch	175 ng	750 ng bzw. 75 ng pro Loch
pGL4.74 Vektor	25 ng bzw. 6,25 ng bei Überexpressionsversuch	25 ng	250 ng bzw. 25 ng pro Loch
pcDNA3.1 oder pcDNA3.1_HNF1α	61,25 ng		
PLUS Reagenz			1 µl
HEK-293 und A2780: Verdünnt in einem Endvolumen von 25 µl in OptiMEM HEPG2: Verdünnt in einem Endvolumen von 200 µl OptiMEM			
Lipofektamin2000	0,5 µl	0,5 µl	
Lipofektamin			3,5 µl
OptiMEM	24,5 µl	24,5 µl	

Bei HEK-293- und A2780-Zellen wurden jeweils 25 µl der so verdünnten DNA zunächst für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 25 µl des verdünnten Lipofectamine2000 gemischt und nochmals für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Ansatzes pro Loch auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert.

Bei HEPG2-Zellen wurde die verdünnte DNA nach Zusatz des PLUS-Reagenz zunächst für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lipofektamin zugegeben und noch mal für 25 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 20 µl der Transfektionslösung pro Loch auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert.

Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und gegen 75 µl antibiotikafreies Medium ersetzt. Es folgte die Messung der Lumineszenz.

#### **2.2.16.2 Messung der Lumineszenz**

Für die Messung der Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität wurde das Dual-Glo Luciferase Assay System von Promega verwendet. Dabei wurde zunächst die Firefly-Luciferase Aktivität gemessen. Es wurden 75 µl des Substrats Beetle Luciferin hinzugegeben und nach 10 Min. die Aktivität mittels Luminometer gemessen (Tristar LN 941 Berthold Technologies). Anschließend wurden 75 µl des Reagenz Stop and Glo hinzugegeben. Dieses beinhaltet zum einen einen Inhibitor des Enzyms Firefly-Luciferase und gleichzeitig das Substrat Coelenterazine für die Renilla-Luciferase. Nach 10 Min. Inkubation konnte somit die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen werden.

#### **2.2.17 Transfektion von HEK-293-Zellen für EMSA-Versuche**

Das Überexpressionsplasmid pcDNA3.1\_HNF1α (siehe 2.2.8.7) wurde in HEK-293-Zellen transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  HEK-293-Zellen in einer 10 cm. Zellkulturschale in antibiotikafreiem DMEM Medium mit 10 % FKS ausgesät. Für die Transfektion wurden 24 µg pcDNA3.1\_HNF1α Überexpressionsvektor in 1500 µl Opti-MEM Medium verdünnt. Ebenfalls wurde 60 µl Lipofectamine2000 in 1440 µl Opti-MEM Medium verdünnt und für 5 Min. inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und nochmals für 20 Min. inkubiert. Der Gesamtansatz von 3 ml wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Expression des

Proteins HNF1 $\alpha$ . Anschließend wurden Zellkernextrakte gewonnen (siehe 2.2.13) und diese im EMSA (siehe 2.2.18) untersucht.

## **2.2.18 EMSA**

Der EMSA dient dazu eine spezifische Interaktion zwischen kurzen Oligonukleotidpaaren und Proteinen nachzuweisen. Um letztendlich nachweisen zu können ob eine Interaktion vorliegt, müssen die hergestellten OliN mit dem HEK-293-Zellkernextrakt nach einem bestimmten Schema zunächst pipettiert, inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert werden. In dieser Arbeit wurde zunächst ein Screening auf potentielle Bindungsstellen durchgeführt, anschließend erfolgte eine weitere Evaluierung. Jedes Experiment wurde 2 Mal unabhängig voneinander wiederholt.

### **2.2.18.1 EMSA-Screening**

Während der Inkubation der OliN mit dem Zellkernextrakt kommt es zu Bindungen zwischen den OliN und den Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkernextrakt. Je nach Gewicht und Konformation der entstehenden Komplexe wandern diese in der anschließenden Elektrophorese unterschiedlich schnell durch das Gel in Richtung Anode, sodass bei der anschließenden Visualisierung ein Bandenmuster entsteht. Um nun die Bande zu identifizieren, die auf einer spezifischen Interaktion von OliN und HNF1 $\alpha$  beruht, werden für die Untersuchung einer Bindungsstelle OliN mit und ohne Fluoreszenzlabeling benutzt. Beide können mit HNF1 $\alpha$  gleichermaßen interagieren, jedoch können nur gelabelte OliN visualisiert werden. Durch Zugabe eines Überschusses an ungelabelten OliN binden diese wahrscheinlicher an den Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  als die gleichzeitig vorhandenen gelabelten OliN.

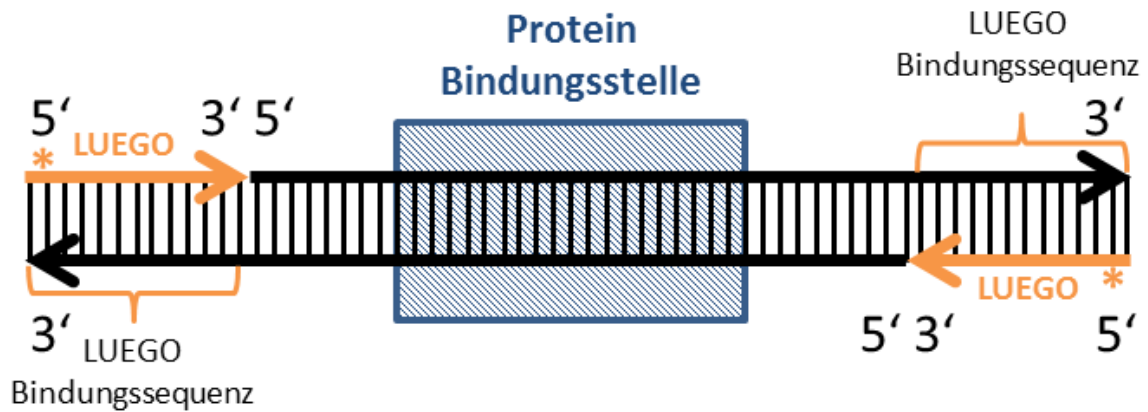
### **2.2.18.2 EMSA-Evaluierung**

Zur weiteren Evaluierung der Spezifität der Bindungen erfolgten weitere Untersuchungen der Bindungsstellen in unabhängigen Ansätzen. Neben der Wiederholung der Ansätze aus dem Screening, wurden hier zusätzlich noch ungelabelt Oligonukleotide der Negativkontrolle, im Sinne einer Gegenkompetition, hinzugegeben. Da diese durch den Basenaustausch nicht mehr die für HNF1 $\alpha$  essentiellen Bindungssequenzen aufweisen,

interagieren sie auch im Überschuss nicht mehr mit HNF1 $\alpha$ . Folglich bleibt die spezifische Bande weiter bestehen. Durch die Zugabe eines Antikörpers in einem weiteren Ansatz, der gegen HNF1 $\alpha$  gerichtet ist, kann es zum sog. Supershift der spezifischen Bande kommen. Dabei bindet der Antikörper an den HNF1 $\alpha$ -Oligonukleotidkomplex wodurch sich dessen Laufeigenschaften im Gel verändern. Durch das erhöhte "Gewicht" und die veränderte Konformation läuft der Komplex aus Antikörper-HNF1 $\alpha$  und Oligonukleotid langsamer als der Komplex HNF1 $\alpha$  und Oligonukleotid, was sich visuell als Supershift darstellt. Durch die Hinzugabe eines Antikörpers der nicht gegen HNF1 $\alpha$  gerichtet ist, in diesem Falle durch die Hinzugabe von Anti-GABP- $\beta$ 1/2-Antikörper, werden spezifische Oligonukleotidkomplex nicht verändert. Ein Supershift bleibt somit bei spezifischen Banden aus.

### **2.2.18.3 Vorbereitung der EMSA-Oligonukleotide**

Oligonukleotide bestehen aus nur wenigen Nukleotiden und sind einzelsträngig. Für den EMSA mussten diese zunächst zu doppelsträngigen DNA-Stücken hybridisiert und gelabelt werden (Abbildung 4). Für das Labeling der OliN wurde die LUEGO Technik angewandt. Bei der LUEGO Technik (Jullien et al., 2011) tragen die OliN jeweils am 3'-Ende eine immer gleiche kurze Sequenz von 14 Nukleotiden an die dann das universale LUEGO OliN angelagert wird. Dieses ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY682 markiert wodurch die OliN anschließend mittels Li-COR Odyssey infrarot Fluoreszenzscanner visualisiert werden können. Die LUEGO-Sequenz, ursprünglich aus der murinen SINE B1 Sequenz, zeigt selber keine Homologien zu bekannten spezifischen Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Jullien et al., 2011). Die OliN wurden zunächst auf 20 pmol/ $\mu$ l in 1 x TE Puffer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Dann wurde jeweils 5  $\mu$ l Se und As OliN mit 5  $\mu$ l LUEGO OliN (100 pmol/ $\mu$ l) nach folgendem Schema inkubiert: 2 Min. bei 94°C, Absenkung der Temperatur um 5°C/s auf 70°C, 70°C für 5 Sek., langsames Herunterkühlen auf 18°C, 18°C für 10 Min. ungelabelte OliN wurden analog hergestellt mit einem ungelabelten LUEGO OliN (100 pmol/ $\mu$ l). Bis zur weiteren Verwendung wurden die OliN bei -20°C gelagert und anschließend noch weiter auf die gewünschten Konzentrationen in Aqua dest. verdünnt. Die gelabelten OliN wurden auf 25 fmol/ $\mu$ l, die ungelabelten OliN auf 1000 fmol/ $\mu$ l verdünnt. Wurden nun beide OliN in gleichen Volumina im EMSA eingesetzt (jeweils 1  $\mu$ l), so lagen die ungelabelten OliN damit im 40-fachen Überschuss vor (Kompetition). Dieses Verhältnis und die angegebenen Verdünnungen stellten sich in Etablierungsversuchen als ideal heraus.



**Abbildung 4: Prinzip der Oligonukleotid Hybridisierung und Labeling.** Se und As OliN werden zu einem doppelsträngigen OliN hybridisiert, welches in der Mitte die Protein Bindungsstelle aufweist (blau schraffiertes Rechteck). Jeweils am 3'-Ende der OliN befindet sich die LUEGO Bindungssequenz an die das LUEGO OliN bindet. Dieses ist an seinem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY682 markiert (Sternchen).

#### 2.2.18.4 Gießen des EMSA-Gels

Für den EMSA wurde ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel (6%ig) benötigt. Dafür wurde zunächst eine Gießvorrichtung bestehend aus 2 Glasplatten, einem Abstandhalter und ein Gestell aufgebaut: Das Gel wurde oben zwischen die beiden Glasplatten gegossen und härtet in vertikaler Position aus. Durch das Einstecken eines Kamms von oben in das Trenngel wurden Laufaschen für die Proben ausgespart. Es wurde sowohl ein Verschlussgel am Boden als auch ein Trenngel benötigt (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Gele für den EMSA**

Gel	Substanz	Menge
Trenngel (6%ig)	40 % Acrylamid	3,1 ml
	Acrylamid 40 (29:1)	2,9 ml
	APS (10 %)	300 µl
	Aqua dest.	30,43 ml
	80 % Glycerol	1,25 ml
	TEMED	20 µl
	10 x TBE Puffer	2 ml
Verschlussgel	Acrylamid 40 (29:1)	3 ml
	APS (10 %)	30 µl
	Resolving Puffer	3 ml
	TEMED	30 µl



### **2.2.18.5 Inkubation, Elektrophorese und Visualisierung des EMSA**

Die OliN wurden mit 5 µg Zellkernextrakt und den Puffern 10 x Binding Buffer; 25 mM DTT/2,5 % Tween20; 1µg/ml Poly (dIDdC) und 50 % Glycerol aus dem Kit (Odyssey EMSA Buffer Kit, Li-COR, Lincoln, NE, USA) jeweils 2-2-1-1 µl für 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Kompetition und Gegenkompetition wurde noch ein 40-facher Überschuss an ungelabelten Proben hinzugegeben. Für den Supershift wurden 2 µg des HNF1α-Antikörpers bzw. 2 µg des GABP-β1/2-Antikörpers zunächst mit 5 µg Zellkernextrakt für 60 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln vorinkubiert. Anschließend wurden die gleichen EMSA-Puffer zugegeben wie oben und erneut für 60 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden auch hier die OliN hinzu pipettiert und für 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Vor dem Auftragen wurden noch 2 µl Probenpuffer hinzugegeben (10 x Orange Loading Dye). Anschließend wurden 20 µl je Probe auf einem 6%igen Polyacrylamidgel in 0,5 x TBE Puffer aufgetrennt (150 V, bei Raumtemperatur im Dunkeln für ca. 2-3 h). Die Gele wurden anschließend auf dem Odyssey Li-COR infrarot Fluoreszenzscanner visualisiert.

### **2.2.19 Statistik und Grafik**

Für *in silico* Analysen wurden folgende Computerprogramme verwendet: Gene2Promoter und MatInspector von Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) und Gene Promoter Miner vom Institute of Bioinformatics der National Chiao University, Taiwan (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/>). Für die initiale Datenauswertung der Lumineszenzmessungen wurde die Software MicroWin 200 verwendet. Es wurde zunächst der Quotient Firefly-Luciferase Aktivität zu Renilla-Luciferase Aktivität berechnet. Die Versuche wurden jeweils im 4-fach Ansatz durchgeführt und zusätzlich fünf Mal unabhängig voneinander wiederholt. Je Versuch wurde der Mittelwert aus den 4 pGL4.10 Leervektormesswerten gebildet und anschließend der Quotient zwischen den Einzelmesswerten und den pGL4.10 Mittelwert gebildet. Dadurch wurde die Aktivität des pGL4.10 Leervektors auf 1 normiert und alle übrigen Messwerte relativ darauf bezogen. Aus den so erhaltenen Daten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung ist in Form eines Fehlerbalkens in den Abbildungen wiedergegeben. Für die Datenauswertung und Erstellung der Grafiken wurde das Programm Graph Pad Prism 5.01 (Graph Pad Software, La Jolla, Ca, USA) verwendet. Statistische Vergleiche von mehreren Konstrukten untereinander erfolgten mit Hilfe des ANOVA und verschiedener post-Tests: Dunnett's Multiple Comparison post-Test beim

Vergleich mehrerer Konstrukte gegen ein Referenzkonstrukt (pGL4.10 Leervektor), Tukey's Multiple Comparison post-Test beim Vergleich aller Konstrukte gegeneinander und Sidak's Multiple Comparison post-Test beim Vergleich von ausgewählten Konstrukten gegeneinander. Wurden nur zwei Konstrukte miteinander verglichen kam der Student's t-Test zur Anwendung. Die Daten der F1-Aktivitätsmessungen (Positivkontrolle) wurden in die statistischen Auswertung nicht mit einbezogen. Unterschiede wurden bei einem  $p < 0,05$  als statistisch signifikant erachtet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 *In silico* Analysen

##### 3.1.1 *In silico* Identifizierung der putativen *FNTB-F2*-Promotorregion

Mittels des Computerprogramms Gene2Promoter von Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) wurde für die in Vorarbeiten identifizierte *FNTB-F2*-Variante (siehe 1.4.4) ein 603 bp langer DNA-Abschnitt als putative Kernpromotorregion identifiziert. Zusätzlich wurde mittels des Computerprogramms Gene Promoter Miner (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/>) nach typischen Promotorelementen wie TATA-Boxen, GC-Boxen und CCAAT-Boxen gesucht. Es konnten insgesamt sieben TATA-Boxen, eine GC-Box und zwei CCAAT-Boxen in 5'-Richtung vor dem Translationsstartpunkt identifiziert werden. Davon liegen sechs Elemente bereits innerhalb der von Genomatix vorhergesagten Kernpromotorregion. Für die weitere experimentelle Untersuchung wurde daher ein 1969 bp langer DNA-Abschnitt ausgewählt (Abbildung 5), der neben der vorhergesagten Kernpromotorregion mit den sechs promotortypischen Elementen auch noch die vier weiteren Promotorelemente in 5'-Richtung umfasst.

##### 3.1.2 *In silico* Suche nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Mittels des Computerprogramms MatInspector von Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) wurde die in dieser Arbeit charakterisierte Sequenz -1961/+8 auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktorbindungsstellen analysiert. Die Analyse ergab insgesamt 679 mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Für einige Transkriptionsfaktoren wurden gleich mehrere mögliche Bindungsstellen vorhergesagt. Die Anzahl der möglichen Bindungsstellen für die zehn häufigsten Transkriptionsfaktoren kann Tabelle 25 entnommen werden. Abbildung 6 zeigt die Lage der Bindungsstellen innerhalb der Promotorregion. HNF1 $\alpha$  war dabei der Transkriptionsfaktor für den die meisten möglichen Bindungsstellen vorhergesagt wurden. Die genaue Position und Sequenz der vorhergesagten HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen ist Tabelle 5 zu entnehmen.

```

- 1961  tggaagcctg tactttggca aaattagtaa caataattgt tttattgtac agttatgact
      TATA-Box  TATA-Box
- 1901  aaatagaatt ataaatttat aacagaaaca agggcttgat acgtggttat tcacaaagta
- 1841  gcagagaaaa tattttaact ggagatttaa acttcatgga atttagggta gcaaaggaaa
- 1781  tcctcacctc tcgaatctag ctaattctcc aggttggttt gcctaccagt gtgtcccagg
- 1721  gaaggctgac tgcaaaagat tgtaaagaaa tttcccattg atgaaaaacc tacaggatct
- 1661  ttgcagaatt cctaaatgat ggattgctga gttgattcag gtcaagtgtt ttacttatta
- 1601  tctgacctta gactatggga ttgccttttt tttttttttt ttttttgaga tggggtctcg
- 1541  ccctgttgcc aggctgggat gcactggctt actgcacctt ccgcctcccg gggtcacgcc
- 1481  attcgctgc ctcagcctcc agagttagct agactacagg cgcccaccac cacgcctggc
- 1421  taatttttgt attttagtag agacagggtt caccatgtgg ccaggctggt tttgaactcc
- 1361  tgacctccag tgatctgccc tcctcggcct cctagagtgc tgggattaca gtcgtgagcc
- 1301  actgctcctg gtgcgagtat ctttcaaatc tagaccacac ggtatggcag acagtaaaga
- 1241  atcttatatt tcttttcat gttgttatcc cagcacacat tattagagtc taggatgaac
- 1181  agtttcaggt agtaggatga taatgttgta tctcattttt gtggccttcc tcaactgttt
- 1121  aataatcatg ttagtgacca tttattgagt ctcagcacag tgctaaatgc tctccatag
- 1061  tggatcatt caatcctttc actttttatg gatgagaaga ctgagggtta gagacctacc
- 1001  acattggtag gttaatgata cattcatcaa aagtaacaac cttgttagga ggagttgttt
- 941   acagaggata tactagtact ctttcagttt taactaaagc ttccatttac tgatagctca
- 881   atttgtgccc attgccagta aaaacaaatt gatggctgac acctgtaatc ccagcacttt

      GC-Box                      CCAAT-Box
- 821   gggagttcga ggcgggaaga tcacctgagc ccaagagacc aacttgggca acatagcaag
- 761   accctgtctc taccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagtag ctgagcgtgg tggcatgcac
- 701   ctgtagtccc agctacttgg gaagctgagg tgggtgaatt gtttttgagc tcagaagttc
- 641   acagatgagc catgatcgag ccacgggtact ctagcctggg caacagagta aaaccctgtc
- 581   tottaaaaca aaaaacgact atactgattt tgggtactggc ctgggcaaca tagcaagacc

                                TATA-Box
- 521   ctgtgtctat ttaagatgaa agcttttcaa attaaaaaaa aaaacaaaca aaaaataaat
- 461   gcttggtacc tgcttcctat ctgattatca gaagactcgg tttatttggt aagcaataat

      TATA-Box
- 401   ttggtaatag gagttaaacc tataaatagt ggaaggagtc cttagctgtg agtcgtctgt
- 341   tccattcgtt gattctcatt cattcagcaa atacttgagc gccttctacg tgccaggcac
- 281   tgttctagac actcggcata agttgtttaa caaaagaggc caagttgatg cctttatgaa

      CCAAT-Box                      TATA-Box
- 221   actgtttcta ggccaatgag gcagtcaatt aaaagagtta atatctatag ctatctcaat

TATA-Box
- 161   ataaaaatggt aattagaaac gctgtggaga gtaacacctt gggatagagg ggatagggtg

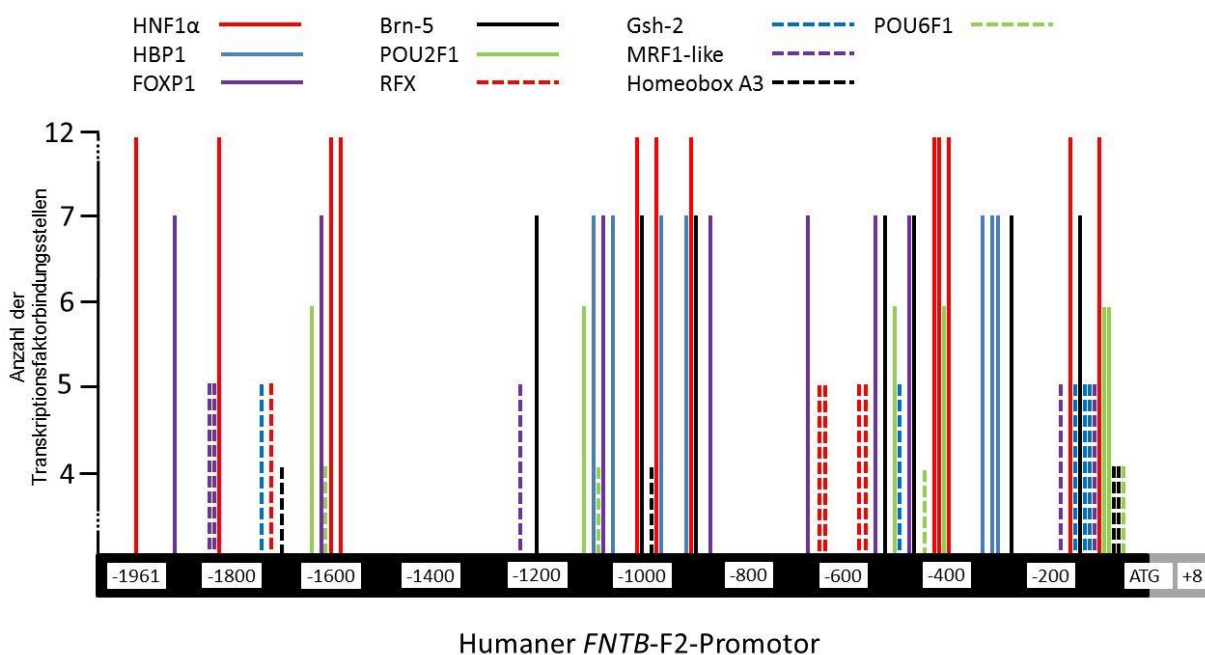
                                TATA-Box
- 101   tgtcaggaat ggggtggggtg ggagcagggg aggtcttcat ataagggtgt aagggggaacc
- 41    ctctggtgac aacacatgtg atctgagacc tgaagtctca gATGaggggag gaagccatca
+ 20    tggatctggt gcaagagtat tctgggcaga gaaagcagca agcacaaagg accaaggcag

```

**Abbildung 5: *In silico* Identifizierung der putativen *FNTB-F2*-Promotorregion.** Der gelb markierte Bereich kennzeichnet die DNA-Region, die mittels Gene2Promoter von Genomatrix als Kernpromotorregion der *FNTB-F2*-Variante identifiziert wurde. Der Translationsstartpunkt ATG wurde rot markiert. Grün markierte Regionen kennzeichnen typische Promotorelemente wie TATA-Boxe, GC-Boxen und CCAAT-Boxen, die mittels Gene Promoter Miner identifiziert wurden. Experimentell wurde in dieser Arbeit der Bereich von -1961 bis +8 als putative Promotorregion untersucht. Die Nummerierung bezieht sich auf das Adenin des Translationsstartpunktes (A = +1).

**Tabelle 25: Übersicht über mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen im *FNTB-F2*-Promotor.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die Anzahl der möglichen Bindungsstellen für die zehn häufigsten Transkriptionsfaktoren innerhalb des *FNTB-F2*-Promotors.

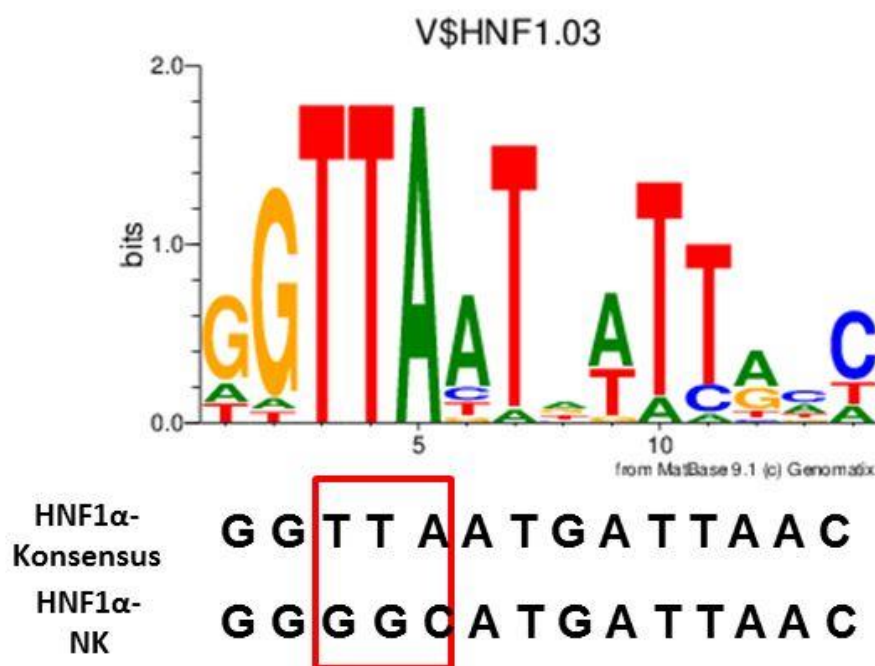
Name des Transkriptionsfaktors	Anzahl der <i>in silico</i> vorhergesagten möglichen Bindungsstellen
Hepatocyte nuclear factor 1 homebox A (HNF1 $\alpha$ )	12
HMG-box transcription factor 1 (HBP1)	7
Alternative splicing variant of FOXP1, activated in ESCs	7
Brn-5, POU-VI protein class (also known as emb and CNS-1)	7
Octamer-binding transcription factor-1, POU class 2 homebox 1 (POU2D1)	6
Motif bound by regulatory factor X (RFX)	5
Homeodomain transcription factor Gsh-2	5
AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	5
Homeobox A3	4
POU class 6 homeobox 1 (POU6F1)	4



**Abbildung 6: Lokalisation der vorhergesagten Transkriptionsfaktorbindungsstellen.** Der schwarze Querbalken symbolisiert schematisch den humanen *FNTB-F2*-Promotor. Die Nummerierung bezieht sich auf das Adenin des Translationsstartpunktes (A = +1). Die Lokalisation der Bindungsstellen der zehn häufigsten Transkriptionsfaktoren innerhalb dieser Region wurde mittels farbiger Balken markiert. Die Höhe der Balken repräsentiert die Anzahl der Transkriptionsfaktorbindungsstellen je Transkriptionsfaktor.

### 3.1.3 *In silico* Planung einer HNF1 $\alpha$ -Negativkontrolle für den EMSA

Mittels des Computerprogramms MatInspector von Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) wurden in der untersuchten Region 12 mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  vorhergesagt (siehe 3.1.2). Dieser Analyse liegen vier Matrices zugrunde, die unter der Familie V\$HNF1 zusammengefasst werden. Die vier Matrices unterscheiden sich geringfügig in der Konsensussequenz, was durch unterschiedliche Angaben aus voneinander unabhängigen Publikationen resultiert. Für die Erstellung der HNF1 $\alpha$ -Negativkontrolle wurden nun drei Nukleotide aus der Kernkonsensussequenz ausgetauscht. Die Nukleotide in dieser Kernregion sind am stärksten konserviert weshalb ein Austausch in diesem Bereich am wahrscheinlichsten zum Verlust der spezifischen Bindung des Transkriptionsfaktors führt. Abbildung 7 zeigt die Konsensussequenz der Matrix V\$HNF1.03 inklusive der stark konservierten Nukleotide in der Kernregion.



**Abbildung 7: HNF1 $\alpha$ -Konsensussequenz der Matrix V\$HNF1.03.** An jeder Nukleotidposition sind die Nukleotide nach Dominanz von oben nach unten angeordnet. Das am häufigsten an dieser Position vorkommende Nukleotid steht oben. Die relative Größe der Nukleotide spiegelt ihre Häufigkeit zueinander an dieser Position wieder. Die Nukleotide TTAA an den Positionen 3-6 bilden die Kernregion der Konsensussequenz. Aus dieser Konsensussequenz wurde die HNF1 $\alpha$ -Konsensus- und Negativkontrolle für diese Arbeit abgeleitet. Die am stärksten konservierten drei Nukleotide TTA wurden für die HNF1 $\alpha$ -Negativkontrolle gegen GGC ausgetauscht (roter Kasten). Abbildung nach Genomatix.



### 3.2 Experimentelle Identifikation des Transkriptionsstartpunktes der *FNTB-F2*-Variante

Da die *FNTB-F2*-Promotorregion zunächst nur mittels einer *in silico* Analyse identifiziert wurde, erfolgte zusätzlich die Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes experimentell mittels einer 5'RACE Untersuchung. Dabei wurden sieben alternative Transkriptionsstartpunkte ermittelt: Bei vier Klonen wurde eine Lokalisation des 5'-Endes an Position -492 bp in 5'-Richtung ausgehend vom Translationsstartpunkt ermittelt, bei sechs Klonen bei -506 bp, bei neun Klonen bei -515 bp, bei vier Klonen bei -540 bp und bei jeweils einem Klon bei -605 und -687 bp. Die Haupttranskriptionsregion liegt somit im Bereich zwischen -519 und -488 (Abbildung 8).

```

- 821   gggagttcga ggcgggaaga tcacctgagc ccaagagacc aacttgggca acatagcaag
- 761   accctgtctc taccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagtag ctgagcgtgg tggcatgcac

      1 Klon
- 701   ctgtagtccc agctacttgg gaagctgagg tgggtgaatt gtttttgagc tcagaagttc

      1 Klon
- 641   acagatgagc catgatcgag ccacggtact ctagcctggg caacagagta aaacctgtc

      4 Klone
- 581   tcttaaaaca aaaaacgact atactgattt tgggtactggc ctgggcaaca tagcaagacc

      9 Klone  6 Klone  4 Klone
- 521   ctgtgtctat ttaagatgaa agcttttcaa attcaaaaaa aaaacaaaca aaaaataaat
- 461   gcttggtacc tgcttcctat ctgattatca gaagactcgg tttatttggt aagcaataat
- 401   ttggtaatag gagttaaaacc tataaatagt ggaaggagtc cttagctgtg agtcgtctgt
- 341   tccattcgtt gattctcatt cattcagcaa atacttgagc gccttctacg tgccaggcac
- 281   tgttctagac actcggcata agttgttaaa caaaagaggc caagttgatg cctttatgaa
- 221   actgtttcta ggccaatgag gcagtcaatt aaaagagtta atatctatag ctatctcaat
- 161   ataaaatgtt aattagaaac gctgtggaga gtaacacctt gggatagagg ggatagggtg

      3'-acaa ttcccccttgg
- 101   tgtcaggaat ggggtggggtg ggagcagggg aggtcttcat ataaggtggt aaggggaacc
      gagaccact-5'  GSP FNTB F2 As
- 41    ctctgggtgac aacacatgtg atctgagacc tgaagtctca gATGaggggag gaagccatca
+ 20    tggatctggt gcaagagtat tctgggcaga gaaagcagca agcacaagg accaaggcag

```

**Abbildung 8: Identifikation des Transkriptionsstartpunktes durch 5'RACE:** Ausschnitt der untersuchten 5'-untranslatierten Region des humanen *FNTB-F2*-Promotors. Das rot markierte ATG kennzeichnet den Translationsstartpunkt der *FNTB-F2*-Variante. Die grün markierten Nukleotide markieren die identifizierten alternativen Transkriptionsstartpunkte. Die Nummerierung bezieht sich auf das Adenin des Translationsstartpunktes (A = +1). Der blaue Kasten kennzeichnet den Bereich der Haupttranskriptionsregion. Die Lage des genspezifischen Primers (GSP) mit dem die 5'RACE durchgeführt wurde ist gelb gekennzeichnet.

### 3.3 Basale Promotoraktivität

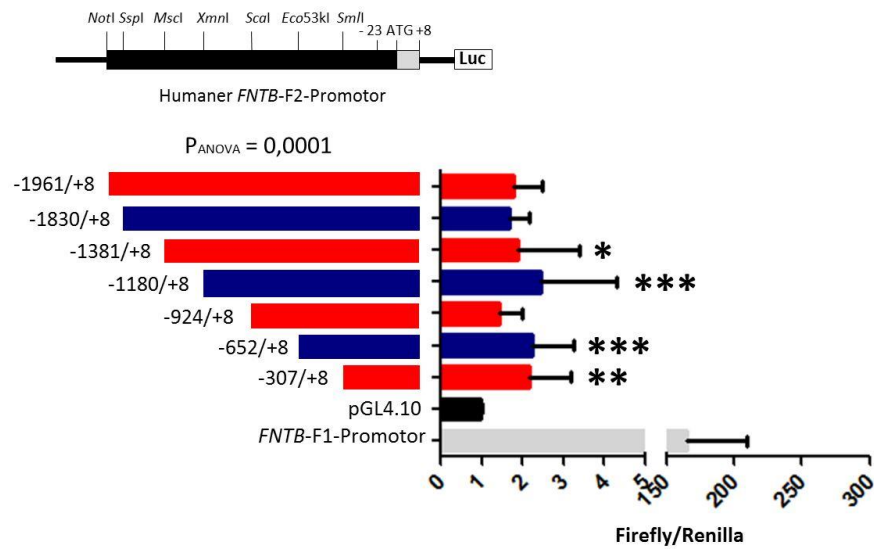
Um die basale Promotoraktivität des *in silico* identifizierten Abschnitts in verschiedenen Zelllinien zu bestimmen, wurde dieser zunächst kloniert und davon ausgehend 5'-Deletionskonstrukte erstellt. Anschließend wurde die basale Promotoraktivität der erstellten Konstrukte im Luciferase-Reporterassay in HEK-293-Zellen, A2780-Zellen und HEPG2-Zellen ermittelt. Als Positivkontrolle wurde die Aktivität des *FNTB*-F1-Promotors mitbestimmt, der in Vorarbeiten eine deutliche Aktivität aufwies (Lazik, 2010).

#### 3.3.1 Basale Promotoraktivität in HEK-293-Zellen

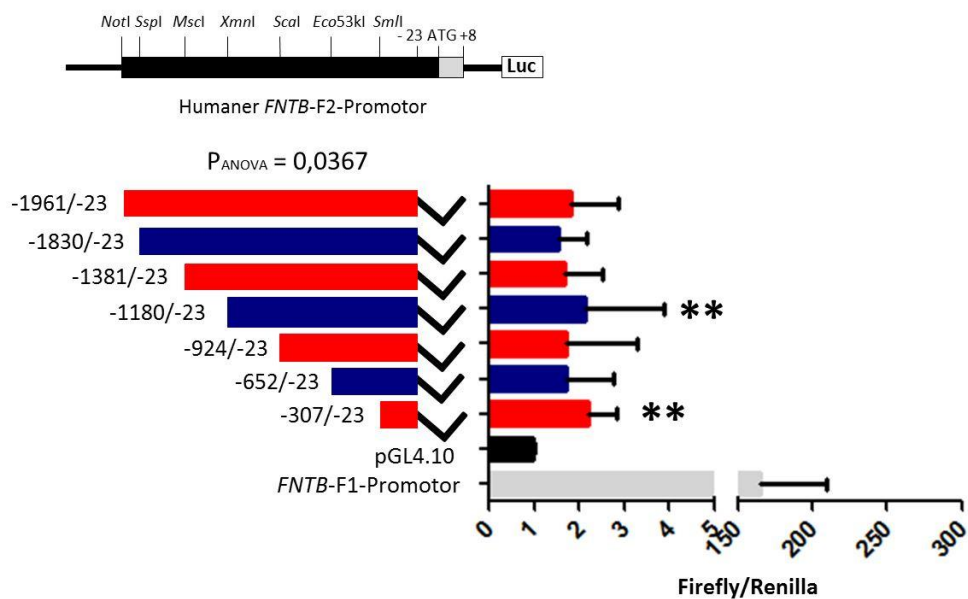
In HEK-293-Zellen zeigte sich, dass die erstellten 5'-Deletionskonstrukte des *FNTB*-F2-Promotors eine bis zu 2-fach erhöhte Aktivität gegenüber dem pGL4.10 Leervektor aufwiesen ( $p = 0,0001$ ). Untereinander zeigten die unterschiedlich langen Deletionskonstrukte keine deutlich unterschiedliche Promotoraktivität (Abbildung 9A). Zusätzlich wurde die Promotoraktivität von 5'-Deletionskonstrukten ohne Translationsstartpunkt unter den gleichen Versuchsbedingungen in HEK-293 ermittelt (Abbildung 9B). Dabei zeigte sich, dass die erstellten 5'-Deletionskonstrukte auch ohne den Translationsstartpunkt am 3'-Ende eine bis zu 2-fache Aktivität gegenüber dem pGL4.10 Leervektor aufwiesen ( $p = 0,0367$ ). Die Aktivität jedes Konstrukts mit ATG wurde mit dem korrespondierenden Konstrukt ohne ATG im t-Test verglichen. Hierbei zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Konstrukten. Ohne ATG war die Aktivität zwischen den einzelnen Konstrukten ebenfalls nicht deutlich unterschiedlich. Zusätzlich zu den 5'-Deletionskonstrukten wurde auch die basale Promotoraktivität eines um 708 bp am 3'-Ende verkürzten Konstruktes in HEK-293-Zellen gemessen (Abbildung 10). Im ANOVA zeigte sich im Vergleich zum pGL4.10 Leervektor keine signifikant veränderte Aktivität dieses Konstruktes. Als Kontrolle wurde die Aktivität des -1961/+8 *FNTB*-F2-Promotorkonstrukts und des F1-Promotors mit gemessen.



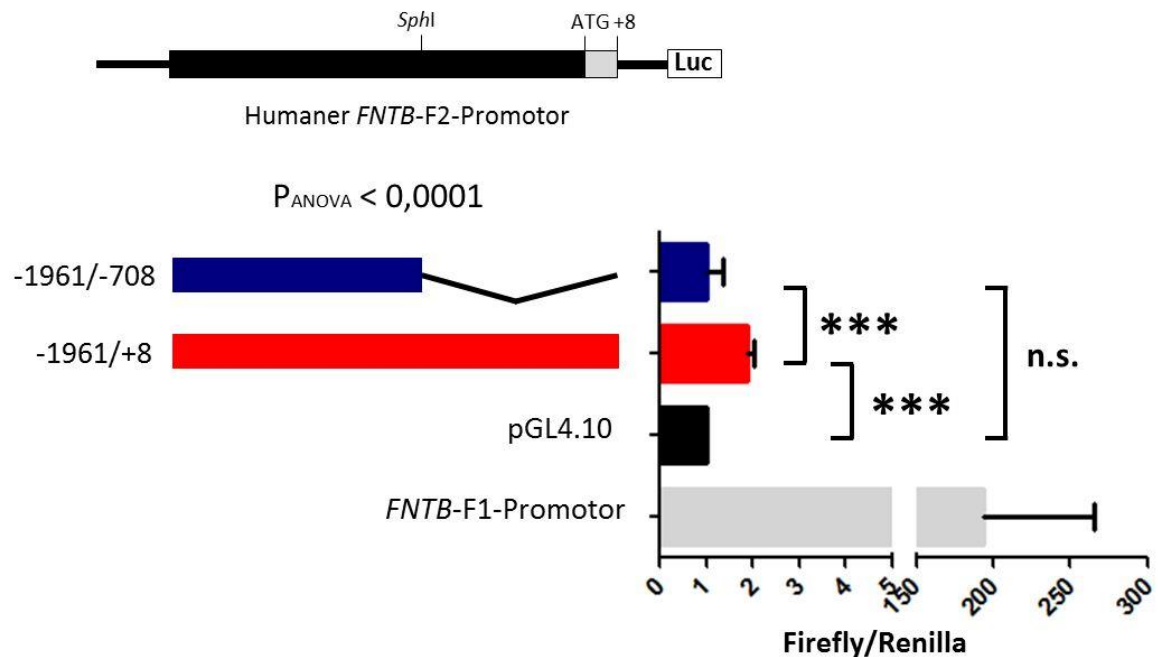
A



B



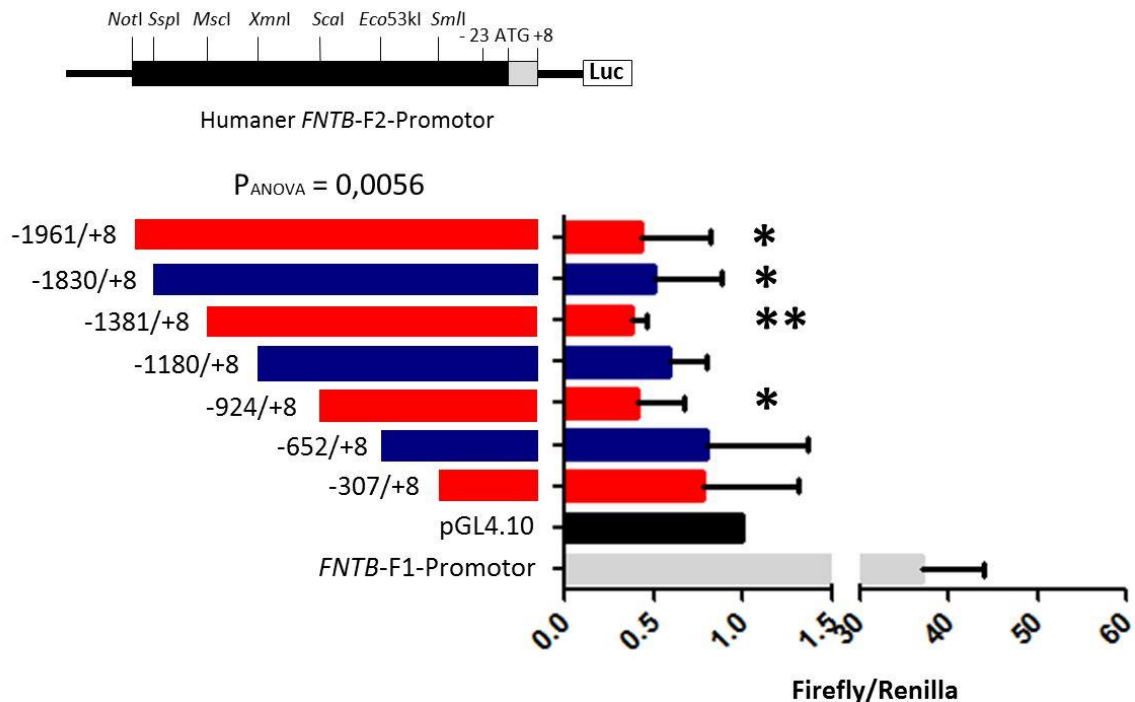
**Abbildung 9: Basale Promotoraktivität in HEK-293-Zellen.** Die Balken auf der linken Seite der Grafik repräsentieren die erstellten 5'-Deletionskonstrukte. Die korrespondierenden Balken auf der rechten Seite deren gemessene Promotoraktivität mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Darüber ist schematisch der *FNTB*-F2-Promotor abgebildet inklusive der Lage der Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme mithilfe derer die Konstrukte erstellt wurden. A: Promotoraktivität der Konstrukte mit Translationsstartpunkt. B: Promotoraktivität der Konstrukte ohne Translationsstartpunkt. ANOVA und Dunnett's Multiple Comparison post-Test der einzelnen Konstrukte gegen den pGL4.10 Leervektor als Referenz: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .



**Abbildung 10: Basale Promotoraktivität in HEK-293-Zellen bei Deletion im 3'-Bereich.** Die Balken auf der linken Seite der Grafik repräsentieren die erstellten Deletionskonstrukte. Die korrespondierenden Balken auf der rechten Seite deren gemessene Promotoraktivität mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Darüber ist schematisch der *FNTB*-F2-Promotor abgebildet inklusive der Lage der Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme mithilfe derer die Konstrukte erstellt wurden. ANOVA und Tukey's Multiple Comparison post-Test des 3'-Deletionskonstrukts, des Gesamtkonstrukts und des pGL4.10 Leervektors gegeneinander: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

### 3.3.2 Basale Promotoraktivität in A2780-Zellen

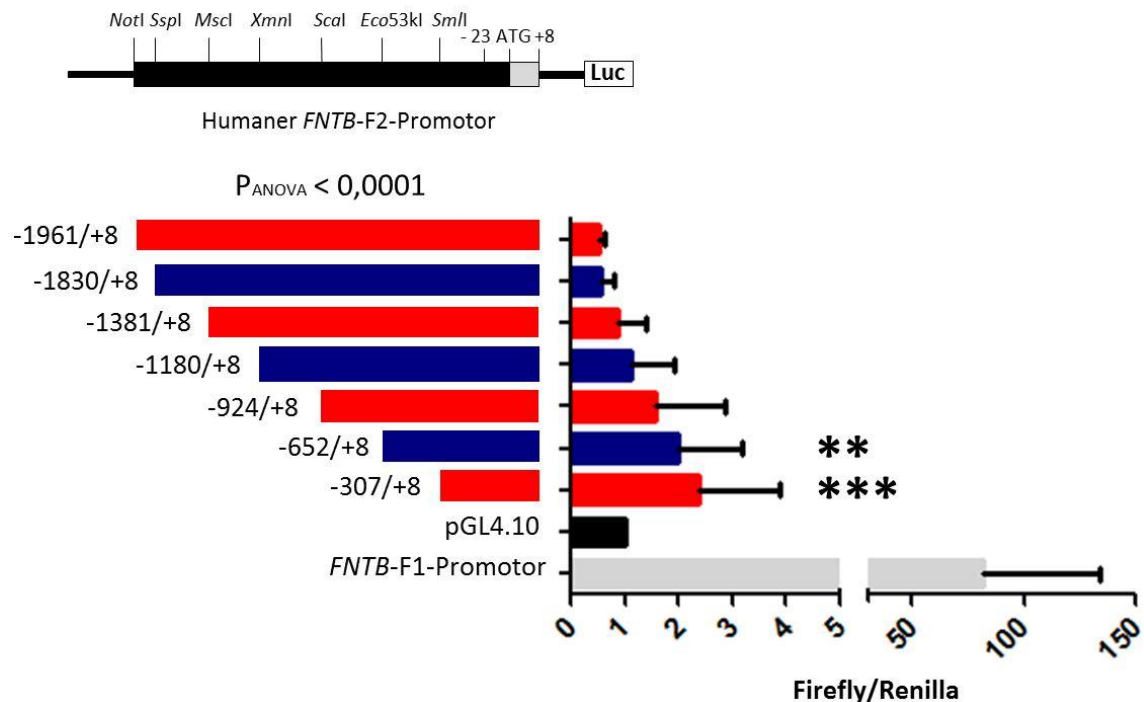
Als zweites erfolgte die Messung der basalen Promotoraktivität der erstellten Promotorkonstrukte in A2780-Zellen (Abbildung 11). Alle untersuchten Konstrukte wiesen eine geringere Aktivität als der pGL4.10 Leervektor auf ( $p = 0,0056$ ). Bei den Konstrukten -1381/+8 und -924/+8 betrug die Aktivität sogar nur die Hälfte der Aktivität des Leervektors. Die Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten waren nicht deutlich unterschiedlich.



**Abbildung 11: Basale Promotoraktivität in A2780-Zellen.** Die Balken auf der linken Seite der Grafik repräsentieren die erstellten 5'-Deletionskonstrukte. Die korrespondierenden Balken auf der rechten Seite deren gemessene Promotoraktivität mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Darüber ist schematisch der *FNTB*-F2-Promotor abgebildet inklusive der Lage der Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme mithilfe derer die Konstrukte erstellt wurden. Promotoraktivität der Konstrukte mit Translationsstartpunkt in A2780-Zellen. ANOVA und Dunnett's Multiple Comparison post-Test der einzelnen Konstrukte gegen den pGL4.10 Leervektor als Referenz: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

### 3.3.3 Basale Promotoraktivität in HEPG2-Zellen

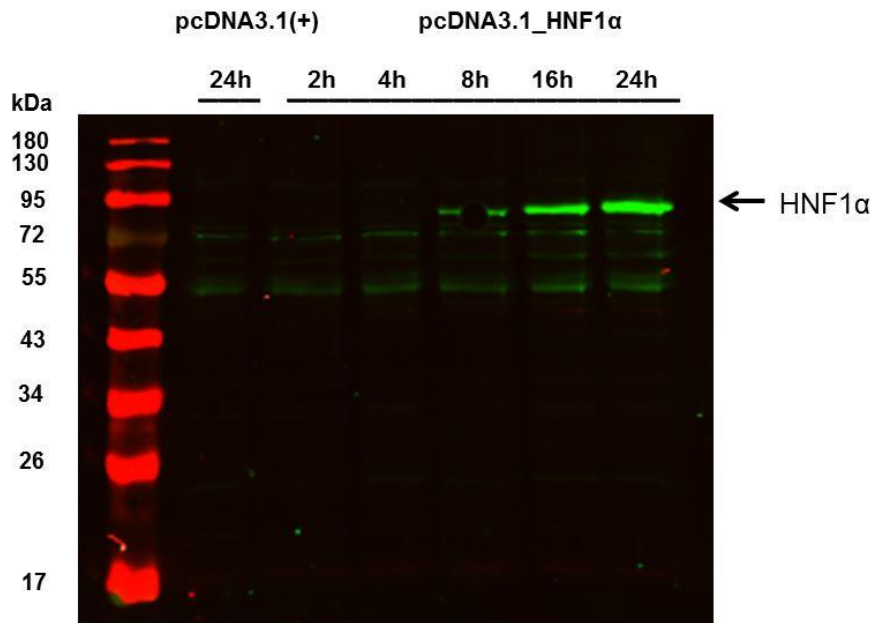
Als drittes erfolgte die Messung der basalen Promotoraktivität der erstellten Promotorkonstrukte in HEPG2-Zellen (Abbildung 12). Die geringste Aktivität wiesen dabei die beiden längsten Deletionskonstrukte -1961/+8 und -1830/+8 auf. Mit zunehmender Verkürzung der Konstrukte am 5'-Ende nahm dann die gemessene Promotoraktivität zu. Die höchste Aktivität wurde bei den beiden kürzesten Promotorkonstrukt -307/+8 und -652/+8 ermittelt. Hier betrug die Aktivität das Doppelte gegenüber der Aktivität des pGL4.10 Leervektors (-307/+8:  $p = 0,0001$  und -652/+8:  $p = 0,0098$ ).



**Abbildung 12: Basale Promotoraktivität in HEPG2-Zellen.** Die Balken auf der linken Seite der Grafik repräsentieren die erstellten 5'-Deletionskonstrukte. Die korrespondierenden Balken auf der rechten Seite deren gemessene Promotoraktivität mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Darüber ist schematisch der *FNTB*-F2-Promotor abgebildet inklusive der Lage der Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme mithilfe derer die Konstrukte erstellt wurden. Promotoraktivität der Konstrukte mit Translationsstartpunkt in HEPG2-Zellen. ANOVA und Dunnett's Multiple Comparison post-Test der einzelnen Konstrukte gegen den pGL4.10 Leervektor als Referenz: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

### 3.4 Testung des HNF1 $\alpha$ -Expressionsplasmids

Um den Einfluss von HNF1 $\alpha$  auf die *FNTB*-F2-Promotoraktivität zu evaluieren wurde zunächst HNF1 $\alpha$  in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und in HEK-293-Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion war eine deutliche Expression des Proteins in HEK-293-Zellen nachzuweisen (Abbildung 13).



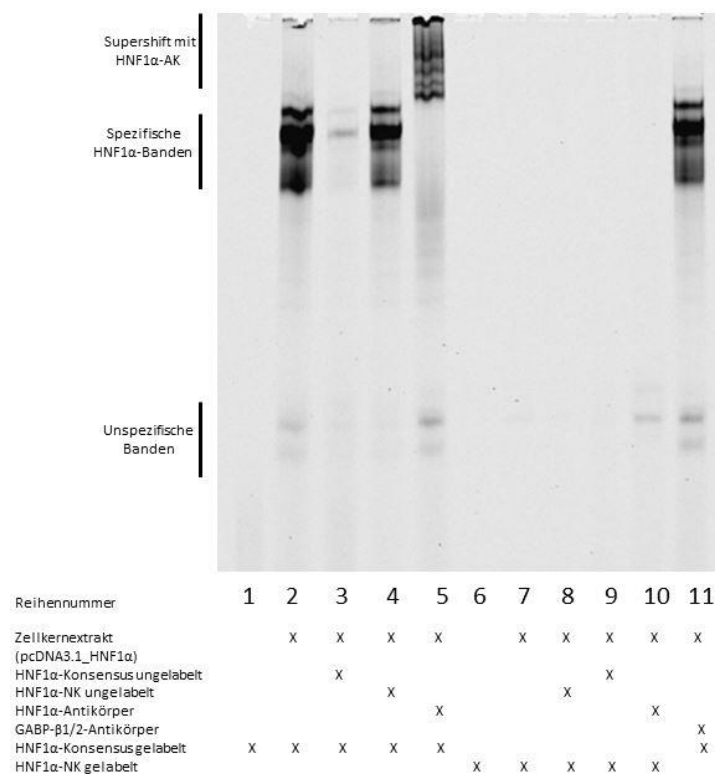
**Abbildung 13: Testung des HNF1 $\alpha$ -Expressionsplasmids.** Western Blot Analyse mit HNF1 $\alpha$ -Antikörpern und HEK-293-Ganzzelllysaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion entweder des leeren pcDNA3.1 Vektors oder des HNF1 $\alpha$ -Überexpressionsplasmids.

### 3.5 Interaktion von HNF1 $\alpha$ mit den vorhergesagten Bindungsstellen

Die mittels *in silico* Analyse für HNF1 $\alpha$  vorhergesagten Bindungsstellen (siehe 3.1.2) wurden zusätzlich experimentell mittels EMSA überprüft. In der vorliegenden Arbeit wurden alle 12 *in silico* vorhergesagten Bindungsstellen untersucht. Jedes Paar EMSA-Oligonukleotide beinhaltete dabei eine vorhergesagte HNF1 $\alpha$ -Bindungsstelle. Die Oligonukleotide überspannten die folgenden Promotorabschnitte: -135/-159, -166/-190, -377/-401, -397/-421, -402/-426, -896/-920, -972/-996, -979/-1003, -1593/-1617, -1595/-1619, -1811/-1835, und -1926/-1950. Die genaue Sequenz der EMSA-Oligonukleotide kann Tabelle 5 entnommen werden. Die EMSA-Experimente wurden mit Zellkernextrakt von HEK-293-Zellen durchgeführt, die zuvor mit pcDNA3.1\_HNF1 $\alpha$  transfiziert wurden. Damit wurde sichergestellt, dass unabhängig von der basalen Expression dieses Transkriptionsfaktors im Zellkernextrakt ausreichend HNF1 $\alpha$ -Protein für die Untersuchung der Interaktion zwischen HNF1 $\alpha$  und den putativen Bindungsstellen im EMSA zur Verfügung stand.

### 3.5.1 Evaluation der HNF1 $\alpha$ -Positiv- und Negativkontrolle

Zunächst wurde das HNF1 $\alpha$ -Konsensusoligonukleotid als Positivkontrolle und die HNF1 $\alpha$ -NK evaluiert (Abbildung 14). Die Inkubation von HEK-293-Zellkernextrakt mit dem Oligonukleotidpaar, das die HNF1 $\alpha$ -Konsensussequenz beinhaltet, ergab drei spezifische HNF1 $\alpha$ -Banden (Reihe 2), die mit einem 40-fachen Überschuss an ungelabelten Oligonukleotid eliminiert werden konnten (Reihe 3). Durch die Hinzugabe eines 40-fachen Überschusses an ungelabelter HNF1 $\alpha$ -NK (Gegenkompetition) konnten die spezifischen Banden nicht eliminiert werden (Reihe 4). Die Hinzugabe des HNF1 $\alpha$ -Antikörpers führte zum Supershift der spezifischen Banden (Reihe 5), während die Hinzugabe des Antikörpers GABP- $\beta$ 1/2 keinen Supershift der spezifischen Banden ergab (Reihe 11). Weitere Banden konnten durch die Hinzugabe des ungelabelten HNF1 $\alpha$ -Konsensus OliN zwar eliminiert werden, zeigten aber nach Hinzugabe des HNF1 $\alpha$ -Antikörpers keinen Supershift (unspezifische Banden). Das analog durchgeführte Experiment mit den OliN der Negativkontrolle zeigte keine spezifischen Banden mit den Zellkernextrakten.



**Abbildung 14: Evaluierung der HNF1 $\alpha$ -Positiv- und Negativkontrolle.** DY682-gelabelte HNF1 $\alpha$ -Konsensus Oligonukleotide (Positivkontrolle) und DY682-gelabelte HNF1 $\alpha$ -NK Oligonukleotide wurden mit Zellkernextrakt aus HEK-293-Zellen, die mit pcDNA3.1\_HNF1 $\alpha$  transfiziert wurden inkubiert. Ein 40-facher Überschuss an ungelabelten Proben, HNF1 $\alpha$ - und GABP- $\beta$ 1/2-Antikörper wurden wie beschrieben hinzugefügt.

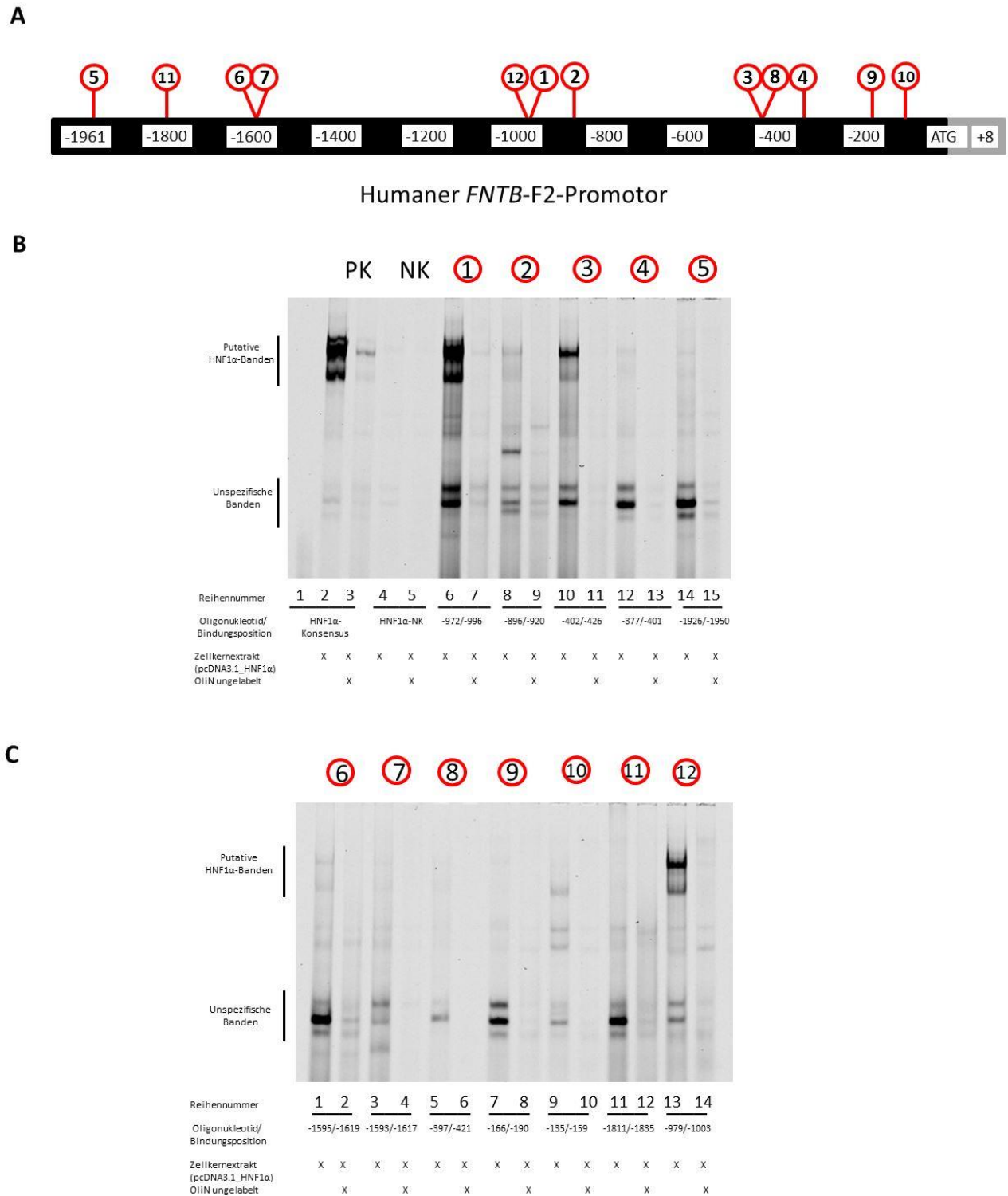
### 3.5.2 EMSA-Screening auf potentielle HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen

Alle 12 *in silico* vorhergesagten Bindungsstellen wurden auf HNF1 $\alpha$  spezifische Banden untersucht. Dafür wurden die Oligonukleotide, die die entsprechenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen beinhalteten in einem ersten Ansatz mit HEK-293-Zellkernextrakten und in einem 2. Ansatz zusätzlich mit einem 40-fachen Überschuss an ungelabelten Oligonukleotiden inkubiert. Die Inkubation von HEK-293-Zellkernextrakten mit den Oligonukleotidpaaren -402/-426, -972/-996, und -979/-1003 ergab spezifische Banden (Reihe 6 und 10, Abbildung 15B und Reihe 13, Abbildung 15C), die mit einem 40-fachen Überschuss an ungelabelten Oligonukleotiden eliminiert werden konnte (Reihe 7 und 11, Abbildung 15B und Reihe 14, Abbildung 15C). Im Vergleich mit der Positivkontrolle (Reihen 1-3, Abbildung 15B) wurden die oberen drei Banden als HNF1 $\alpha$  spezifische Banden interpretiert und somit für die Oligonukleotide -402/-426, -972/-996 und -979/-1003 eine spezifische Interaktion von HNF1 $\alpha$  mit den vorhergesagten Bindungsstellen angenommen. Bei den neun anderen Oligonukleotidpaaren konnten diese spezifischen Banden nicht detektiert werden, woraus der Schluss gezogen wurde, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine experimentell belegbare Interaktion zwischen HNF1 $\alpha$  und den vorhergesagten Bindungsstellen besteht.

### 3.5.3 Evaluierung der identifizierten HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen

Um die angenommene Interaktion zwischen den Oligonukleotidpaaren -402/-426, -972/-996 und -979/-1003 und HNF1 $\alpha$  weiter zu evaluieren wurden mit diesen drei Bindungsstellen EMSA-Supershifts durchgeführt. Auch hier konnte zunächst gezeigt werden, dass die spezifischen Banden bei den drei untersuchten Bindungsstellen (Reihe 2 und 8, Abbildung 16A und Reihe 2, Abbildung 16B) durch die Zugabe eines 40-fachen Überschusses an ungelabelten Oligonukleotiden eliminiert wurden (Reihe 3 und 9, Abbildung 16A und Reihe 3, Abbildung 16B).

Durch die Hinzugabe eines 40-fachen Überschusses an ungelabelten HNF1 $\alpha$ -NK Oligonukleotiden (Gegenkompetition) konnten die spezifischen Banden nicht eliminiert werden (Reihe 4 und 10, Abbildung 16A und Reihe 4, Abbildung 16B). Die Hinzugabe des HNF1 $\alpha$ -Antikörpers führte zum Supershift der spezifischen Banden (Reihe 5 und 11, Abbildung 16A und Reihe 5, Abbildung 16B) während die Hinzugabe des Antikörpers GABP- $\beta$ 1/2 keinen Supershift ergab (Reihe 6 und 12, Abbildung 16A und Reihe 6,

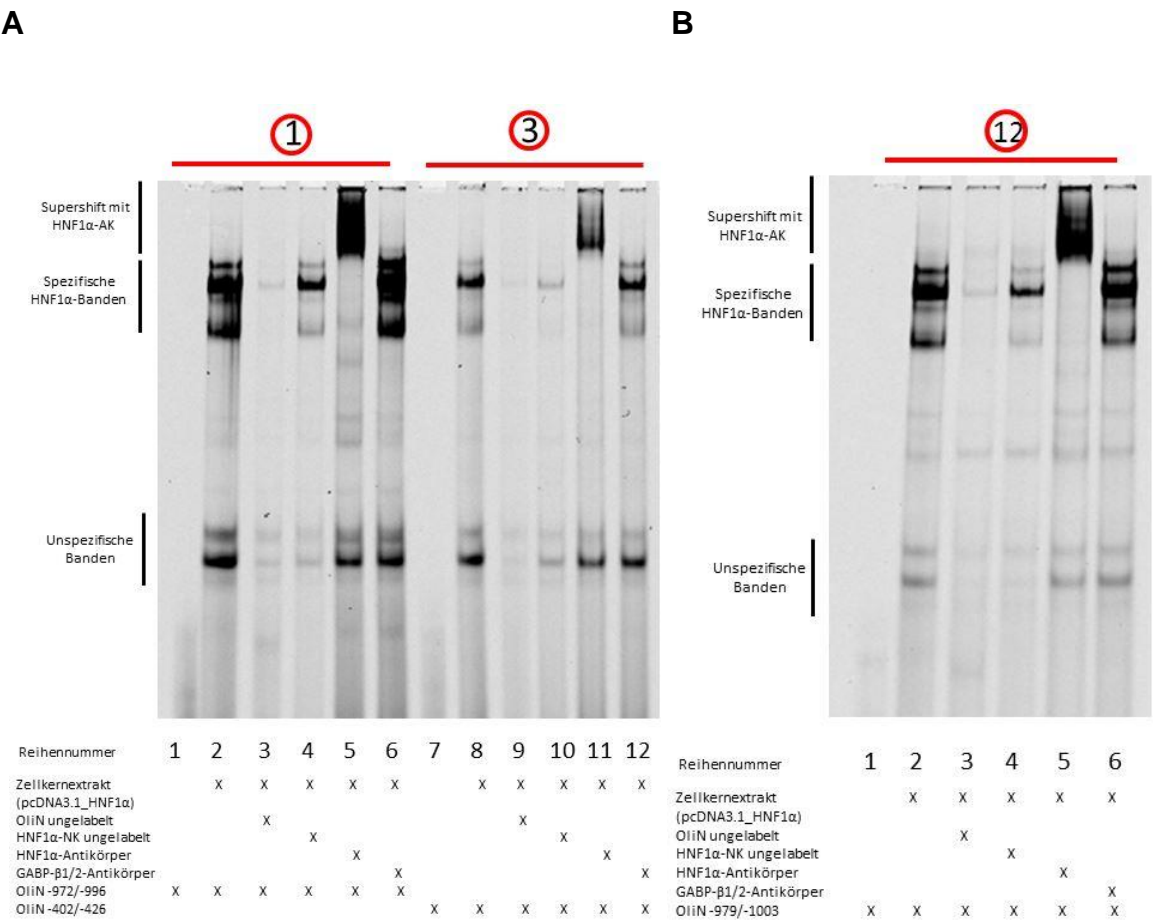


**Abbildung 15: Screening auf potentielle HNF1α-Bindungsstellen.** A: Lokalisation der Bindungsstellen innerhalb der Promotorregion. B + C: Untersuchung der 12 *in silico* vorhergesagten HNF1α-Bindungsstellen. DY682-gelabelte HNF1α-Konsensus Oligonukleotide (Positivkontrolle), DY682-gelabelte HNF1α-NK Oligonukleotide und DY682-gelabelte Oligonukleotide, die die 12 möglichen *FNTB*-F2-Promotorbindungsstellen überspannen, wurden mit Zellkernextrakt aus HEK-293-Zellen, die mit pcDNA3.1\_HNF1α transfiziert wurden inkubiert. Zur Kompetition wurde ein 40-facher Überschuss an ungelabelten Proben hinzugefügt.



Abbildung 16B). Mit diesen drei zusätzliche Ansätzen pro untersuchter Bindungsstelle wurde demnach belegt, dass die beschriebenen spezifischen Banden eindeutig auf eine Interaktion von untersuchtem Oligonukleotid und HNF1α zurückzuführen sind.

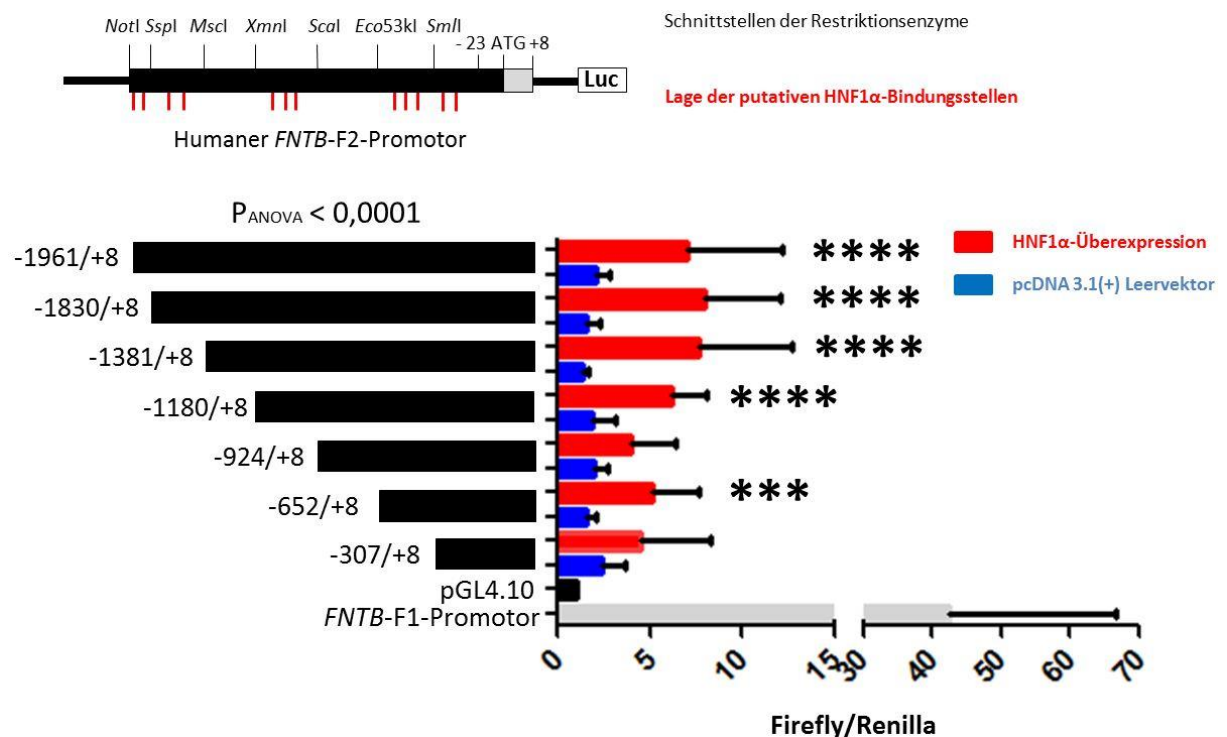
Durch EMSA-Experimente konnten demnach drei der 12 *in silico* vorhergesagten Bindungsstellen von HNF1α im untersuchten *FNTB*-F2-Promotor experimentell bestätigt werden.



**Abbildung 16: Evaluierung der HNF1α-Bindungsstellen.** Weitere Evaluierung der gefundenen Bindungsstellen durch Supershift Analyse. DY682-gelabelte *FNTB*-F2-Promotor Oligonukleotide -972/-996, -402/-426 und -979/-1003 wurden mit Zellkernextrakt aus HEK-293-Zellen, die mit pcDNA3.1\_HNF1α transfiziert wurden inkubiert. Ein 40-facher Überschuss an ungelabelten Proben, HNF1α- und GABP-β1/2-Antikörper wurden wie beschrieben hinzugefügt.

### 3.6 Promotoraktivität unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung einer HNF1 $\alpha$ -Überexpression auf die *FNTB*-F2-Promotoraktivität untersucht (Abbildung 17). Die jeweiligen *FNTB* 5'-Deletionskonstrukte und der pGL4.74 Vektor wurden in HEK-293-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde der pcDNA3.1 Leervektor oder der pcDNA3.1\_HNF1 $\alpha$  Expressionsvektor mittransfiziert. Nach 24 h erfolgte die Messung der Promotoraktivität. Die Unterschiede in der gemessenen Promotoraktivität ohne und mit HNF1 $\alpha$ -Stimulation waren statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Der stärkste Effekt konnte bei den Deletionskonstrukten -1830/+8 und -1381/+8 gemessen werden. Hier betrug die Steigerung das bis zu 7-fache gegenüber dem unstimulierten Versuch.



**Abbildung 17: Promotoraktivität in HEK-293-Zellen unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation.** Die Balken auf der linken Seite der Grafik repräsentieren die erstellten 5'-Deletionskonstrukte. Die korrespondierenden Balken auf der rechten Seite deren gemessene Promotoraktivität mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Darüber ist schematisch der *FNTB*-F2-Promotor abgebildet inklusive der Lage der Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme mithilfe derer die Konstrukte erstellt wurden. Promotoraktivität der Konstrukte mit Translationsstartpunkt in HEK-293-Zellen mit und ohne HNF1 $\alpha$ -Stimulation. ANOVA und Sidak's Multiple Comparison post-Test für den paarweisen Vergleich jedes Konstrukts mit und ohne HNF1 $\alpha$ -Stimulation. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ .

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Identifikation der *FNTB-F2*-Promotorregion

Der erste Schritt bei der Charakterisierung der *FNTB-F2*-Promotorregion bestand darin, diese möglichst genau zu lokalisieren. Dafür wurden in dieser Arbeit sowohl *in silico* wie auch experimentelle Verfahren angewandt.

Durch Genomatix wurde die DNA-Region von -564 bis +39 als potentielle Kernpromotorregion identifiziert. Die Identifikation von insgesamt sechs typischen Promotorelementen (fünf TATA-Boxen und eine CCAAT-Box) innerhalb dieser vorhergesagten Region durch ein weiteres unabhängiges Programm kann als zusätzliches Indiz für die Promotorfunktion dieser Region interpretiert werden. Durch eine 5'RACE Untersuchung wurde der Transkriptionsstartpunkt der *FNTB-F2*-Variante experimentell ermittelt. Es konnten insgesamt sechs alternative Transkriptionsstartpunkte ermittelt werden. Diese liegen in einem Bereich von -492 bis -687 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes. Der Bereich zwischen -519 und -488 konnte als Haupttranskriptionsstartpunkt identifiziert werden, da hier insgesamt 19 der 25 sequenzierten Klone ihr 5'-Ende lokalisiert hatten. Der durch 5'RACE ermittelte Haupttranskriptionsstartpunkt befindet sich somit unmittelbar am Beginn der mittels *in silico* Analyse vorhergesagten Kernpromotorregion. Das Vorhandensein von multiplen Transkriptionsstartpunkten in einem umschriebenen Bereich ist typisch für Promotoren von Säugetieren. Die Transkriptionsstartpunkte sind dabei typischerweise über einen Bereich von etwa 50-100 bp lokalisiert (Anish et al., 2009), so wie dies auch für die *FNTB-F2*-Variante gezeigt werden konnte. Frith et al. konnten allerdings auch zeigen, dass Promotoren mit multiplen Transkriptionsstartpunkten mit ubiquitär exprimierten Genen korreliert sind und häufig keine TATA-Boxen aufweisen, während Promotoren mit engem Transkriptionsstartpunkt eher mit gewebsspezifisch exprimierten Genen korreliert sind und oft über eine TATA-Box verfügen (Frith et al., 2008). In dieser Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, dass die *FNTB-F2*-Variante trotz der multiplen Transkriptionsstartpunkte auch über mehrere TATA-Boxen verfügt. Allerdings befindet sich keine dieser identifizierten TATA-Boxen an der für TATA-Boxen typischen Stelle, ca. 25 bis 30 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. (Thomas et al., 2006). Es kann

daher darüber spekuliert werden, inwieweit die identifizierten TATA-Boxen tatsächlich für die Initiation der Transkription der *FNTB-F2*-Variante notwendig sind.

Die Lokalisation der beiden CCAAT-Boxen in Bezug auf den Identifizierten Transkriptionsstartpunkt in dieser Arbeit deckt sich gut mit den Ergebnissen aus bioinformatischen Analysen an einer großen Zahl von eukaryotischer Promotoren. Dolfini et al. konnten zeigen, dass CCAAT-Boxen sowohl innerhalb der Kernpromotorregion lokalisiert sind, als auch in einem Bereich von bis zu 600 bp in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstartpunkt zu finden sind (Dolfini et al., 2009).

## **4.2 Interpretation der basalen Promotoraktivitätsmessungen in HEK-293-Zellen**

Es konnte demonstriert werden, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen in HEK-293-Zellen ein ca. 2000 bp langer DNA-Abschnitt vor dem Translationsstartpunkt der *FNTB-F2*-Variante basale Promotoraktivität aufweist. Durch die Verkürzung der Konstrukte sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende sollte zudem die Hauptaktivitätsregion innerhalb der untersuchten Promotorregion identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein etwa 700 bp langer DNA-Abschnitt vor dem Translationsstartpunkt der *FNTB-F2*-Variante für die beobachtete basale Promotoraktivität maßgeblich verantwortlich ist. Der Bereich von -708 bis -1961 bp zeigte keine basale Promotoraktivität, während bei einer Verkürzung am 5'-Ende selbst die beiden kürzesten Promotorkonstrukte -652/+8 und -307/+8 noch eine statistisch signifikante Promotoraktivität aufwiesen. Da selbst beim kürzesten 5'-Deletionskonstrukt -307/+8 noch eine doppelte Aktivität gegenüber dem Leervektor gemessen werden konnte, liegt die Hauptaktivitätsregion des *FNTB-F2*-Promotors sehr wahrscheinlich in einem Bereich von etwa 300 bp direkt vor dem Translationsstartpunkt. Auch durch die *in silico* Analysen und die experimentelle Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes mittels 5'RACE wurde der Bereich von etwa 500 bp vor dem Translationsstartpunkt als Kernpromotorregion identifiziert. In der ermittelten Hauptaktivitätsregion von etwa 300 bp vor dem Translationsstartpunkt sind zudem vier typische Promotorelemente lokalisiert: Eine CCAAT-Box bei -205 bis -210 bp und drei TATA-Boxen bei -187 bis -192 bp, -163 bis -158 bp und -63 bis -58 bp. An diese typischen Promotorelemente binden allgemeine

Transkriptionsfaktoren, die für die basale Genexpression verantwortlich sind (Dolfini et al., 2012; O'Connor et al., 2016; Reese, 2003; Shi et al., 2006).

Bei der Charakterisierung eines Promotors wird der Translationsstartpunkt des zu untersuchenden Gens i.d.r. mitkloniert (Nabokina et al., 2013; Wang et al., 2014). In seltenen Fällen kann es jedoch zu einer Interaktion dieses einklonierten Translationsstartpunkts mit dem Translationsstartpunkt des Reporterenzym, der Luziferase kommen. Bei den untersuchten 5'-Deletionskonstrukten liegen zwischen dem ATG der *FNTB*-F2-Variante und dem ATG des Luziferase Reporterenzym im pGL4.10 Vektor insgesamt 63 Basenpaare. Da das ATG der *FNTB*-F2-Konstrukte und das ATG des Reporterenzym in frame liegen, wäre es z.B. möglich, dass die Translation bereits am ATG des einklonierten Promotorkonstrukts startet und somit ein Enzym mit 22 zusätzlichen Aminosäuren exprimiert werden würde. Dies könnte sich nachteilig auf die Enzymaktivität der Luziferase auswirken und somit die Messergebnisse verfälschen. Da die 5'-Deletionskonstrukte mit Translationsstartpunkt zwar signifikante basale Promotoraktivität aufwiesen, aber diese mit einer maximalen Verdopplung der Aktivität gegenüber dem Leervektor nicht besonders hoch ausfiel, wurden zusätzliche Konstrukte erstellt, die den Translationsstartpunkt der *FNTB*-F2-Variante nicht mehr beinhalteten. Da sich die gemessenen Promotoraktivitäten zwischen den Konstrukten mit Translationsstartpunkt und den korrespondierenden Konstrukten ohne Translationsstartpunkt jedoch nicht signifikant unterschieden, konnte ein störender Einfluss des einklonierten Translationsstartpunktes der F2-Variante auf das Luziferase-Reporterassay System somit weitgehend ausgeschlossen werden. Daher wurden alle weiteren Versuche mit den 5'-Promotordeletionskonstrukten durchgeführt, die den Translationsstartpunkt beinhalteten.

In vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits die Promotorregion der *FNTB*-F1-Variante charakterisiert (Lazik, 2010). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die basale Promotoraktivität in HEK-293-Zellen bis zu 80-fach über der Aktivität des pGL4.10 Leervektors lag. Für die F1-Variante ist bekannt, dass diese ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert wird. Die hohe gemessene Promotoraktivität ist somit ein Indiz dafür, dass auch in HEK-293-Zellen eine hohe basale Expression der F1-Variante vorliegt. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass beide Varianten basal in HEK-293-Zellen exprimiert werden, die *FNTB*-F2-Variante allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als die *FNTB*-F1-Variante. Dazu passen auch bisher unveröffentlichte Forschungsergebnisse unserer

Arbeitsgruppe von C. Henne, die die Expression der verschiedenen *FNTB*-Varianten auf mRNA-Ebene in verschiedenen Zelllinien untersucht hat. Hier zeigte sich, dass während die *FNTB*-F1-Variante auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Zelllinien nachzuweisen war, die anderen Varianten nur in bestimmten Zelllinien zu finden waren. So zeigte sich für die F2, dass diese in HEK-293-Zellen auf mRNA-Ebene zwar nachweisbar war, allerdings wesentlich schwächer als die F1-Variante.

Eine mögliche Ursache für die nur geringe basale Expression der F2-Variante in HEK-293-Zellen ist, dass die für die *FNTB*-F2-Expression notwendigen spezifischen aktivierenden Transkriptionsfaktoren in dieser Zelllinie nicht vorhanden sind. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HNF1 $\alpha$  ein bedeutender, aktivierender, spezifischer Transkriptionsfaktor der *FNTB*-F2-Variante ist. HNF1 $\alpha$  wird allerdings nicht in HEK-293-Zellen exprimiert. In Western Blot Untersuchungen konnte in dieser Arbeit ohne HNF1 $\alpha$ -Überexpressionsplasmid kein HNF1 $\alpha$ -Protein in HEK-293-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 13) und auch in der Literatur wird beschrieben, dass HNF1 $\alpha$  in HEK-293-Zellen nicht exprimiert wird (Senkel et al., 2005). Die dennoch beobachtete geringe basale Promotoraktivität lässt sich somit mutmaßlich auf das Vorhandensein verschiedener allgemeiner Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1 (bindet typischerweise an GC-Boxen), NF-Y (bindet typischerweise an CCAAT-Boxen) oder das TATA-Box bindende Protein, TBP (bindet typischerweise an TATA-Boxen) erklären, die möglicherweise an die identifizierten promotortypischen Elemente innerhalb der *FNTB*-F2-Promotorregion binden.

### **4.3 Interpretation der basalen Promotoraktivitätsmessungen in A2780- und HEPG2-Zellen**

Vor dem Hintergrund, dass der untersuchte DNA-Abschnitt in HEK-293-Zellen zwar signifikante basale Promotoraktivität aufwies, diese aber mit einer maximalen Verdopplung gegenüber dem Leervektor nicht besonders hoch ausfiel, stellte sich die Frage wie sich die *FNTB*-F2-Promotoraktivität in anderen Zelllinien verhält. Für weitere Untersuchungen wurden zwei Tumorzelllinien ausgewählt. Zum einen eine humane

Ovarialkarzinomzelllinie (A2780-Zellen) und zum anderen eine humane Leberzellkarzinomzelllinie (HEPG2-Zellen).

A2780-Zellen wurden ausgewählt, da aus Vorarbeiten von C. Henne bereits bekannt war, dass die *FNTB-F2*-Variante auf mRNA-Ebene deutlich in A2780-Zellen nachweisbar war. Ziel war demnach zu evaluieren, ob in A2780-Zellen auch eine erhöhte *FNTB-F2*-Promotoraktivität zu finden sei. Dies war allerdings nicht der Fall. Entgegen den Erwartungen zeigte sich bei den Messungen der basalen Promotoraktivität sogar eine noch geringere Aktivität im Vergleich zum Leervektor.

Als dritte Zelllinie wurden HEPG2-Zellen ausgewählt, da die *in silico* Analyse der Promotorregion auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen für HNF1 $\alpha$  die meisten Bindungsstellen vorhersagte. Da HNF1 $\alpha$  ein Transkriptionsfaktor ist, der vor allem stark in hepatischen Zellen exprimiert wird (Costa et al., 2003), war die Hypothese, dass in einer hepatischen Zelllinie der dort vermehrt vorhandene Transkriptionsfaktor an die Bindungsstellen in der *FNTB-F2*-Promotorregion bindet und somit zu einer erhöhten Promotoraktivität und Expression der *FNTB-F2*-Variante führt. Damit sollte experimentell die Bedeutung von HNF1 $\alpha$  als regulatorischer Transkriptionsfaktor der *FNTB-F2*-Variante weiter untermauert werden. Allerdings entsprachen die Ergebnisse der basalen Promotoraktivitätsmessung in HEPG2-Zellen ebenfalls nicht den Erwartungen. Anstatt einer erhöhten Aktivität wurde auch hier insbesondere bei den langen Deletionskonstrukten eine Verminderung der Aktivität im Vergleich zum Leervektor gemessen, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

Für die beobachtete geringe Aktivität in HEPG2- und A2780-Zellen gibt es gleich mehrere mögliche Erklärungsansätze.

Zum einen handelt es sich bei beiden Zelllinien um Tumorzelllinien. Dies hat zur Folge, dass die Expression von Transkriptionsfaktoren und Enzymen im Vergleich zu nicht maligne transformierten Zelle maßgeblich verändert sein kann. So wurde z.B. für HNF1 $\alpha$  bereits beschrieben, dass seine Expression in HEPG2-Zellen nur 40 % im Vergleich zu primären Leberzellen beträgt (Castell et al., 2006). Auch die Expression von einigen leberspezifischen CYP Enzymen wie z.B. CYP3A4, die maßgeblich durch HNF1 $\alpha$  reguliert werden, ist in HEPG2-Zellen wesentlich geringer als in primären Leberzellen (Hart et al., 2010). Chiang et al. konnten zeigen, dass durch die Stimulation mit HNF1 $\alpha$  die Expression von CYP3A4 in HEPG2-Zellen signifikant gesteigert werden konnte, sodass diese wieder normale metabolische Aktivität aufwiesen (Chiang et al., 2014). Da in dieser

Arbeit gezeigt werden konnte, dass HNF1 $\alpha$  ein wichtiger aktivierender Transkriptionsfaktor der *FNTB-F2*-Variante ist, liegt der Schluss nahe, dass analog zu den CYP Enzymen auch die Expression der *FNTB-F2*-Variante in HEPG2-Zellen eher niedriger ausfällt als unter physiologischen Bedingungen bzw. in primären Leberzellen.

Des Weiteren lässt sich die geringere Aktivität einiger Deletionskonstrukte in HEPG2-Zellen und A2780-Zellen auch als ein hemmender Effekt interpretieren. Es wäre demnach denkbar, dass in diesen Zellen Transkriptionsfaktoren exprimiert werden, die an Silencer Elementen innerhalb der untersuchten Promotorregion binden und somit die Aktivität herabsetzen. Daraufhin wurde in den Ergebnissen der *in silico* Analyse gezielt nach potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen für hemmende Transkriptionsfaktoren gesucht. Dabei wurde zum einen der Transkriptionsfaktor HBP1 als aussichtsreicher Kandidat identifiziert. Er ist in der Lage durch verschiedene Mechanismen die Genexpression zu hemmen. So wurde sowohl eine indirekte Hemmung über die Hemmung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren als auch eine direkte Hemmung durch Bindung an entsprechende Sequenzmotive in der Promotorregion beschrieben (Pan et al., 2013). Bekannt ist bisher eine Hemmung von Zell Wachstums regulierenden Genen wie N-Myc, c-Myc und cyclin D1 (Berasi et al., 2004). Es wurde zudem beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor NF-Y, der typischerweise an CCAAT-Boxen bindet ein bifunktionaler Transkriptionsfaktor ist, der sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Genexpression einwirken kann (Bernadt et al., 2005). Park et al. zeigten bei Koreanern, dass die gemessene Promotoraktivität bei bestimmten Haplotypen des OCTN1 Promotors signifikant unterhalb der Aktivität des Referenzhaplotyps lag. Dies führten sie auf variantenabhängige unterschiedliche Bindeaffinitäten zwischen der CCAAT-box innerhalb des OCTN1 Promotors und NF-Y zurück (H. J. Park et al., 2014). Es ist demnach denkbar, dass auch die Promotoraktivität der *FNTB-F2*-Variante durch den Transkriptionsfaktor NF-Y über die beiden CCAAT-Boxen im *FNTB-F2*-Promotorbereich nicht nur aktiviert, sondern auch reprimiert werden kann. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Ergebnisse der basalen Aktivitätsmessungen in A2780-Zellen. So zeigte sich ausschließlich in den Promotorkonstrukten, die beide CCAAT-Boxen beinhalteten, eine statistisch signifikante Verringerung der Promotoraktivität gegenüber dem PGL4.10 Leervektor (Abbildung 11).



#### 4.4 Bedeutung von HNF1 $\alpha$ bei der Regulation der *FNTB-F2*-Promotoraktivität

Bei der Etablierung der HNF1 $\alpha$ -Positivkontrolle für den EMSA konnten drei Banden als HNF1 $\alpha$  spezifische Banden identifiziert werden. Es ist bekannt, dass durch alternatives Spleißen und Polyadenylierung mindestens drei Transkriptvarianten von HNF1 $\alpha$  existieren (Harries et al., 2009). Es ist daher wahrscheinlich, dass die drei spezifischen Banden aufgrund der Interaktion dieser Varianten mit der HNF1 $\alpha$ -Konsensussequenz zustande kommen. Zusätzlich zu den HNF1 $\alpha$  spezifischen Banden wurden bei der Etablierung und auch in den anschließenden Untersuchungen der einzelnen Bindungsstellen noch weitere Banden identifiziert. Diese zeigten allerdings nach Hinzugabe des HNF1 $\alpha$ -Antikörpers keinen Supershift. Hierbei handelt es sich am ehesten um HNF1 $\alpha$  unabhängige Banden, die durch die Interaktion von anderen Transkriptionsfaktoren zustande kommen, die eine zu HNF1 $\alpha$  ähnliche Konsensussequenz besitzen bzw. räumlich im Bereich der gleichen DNA-Region binden. Bereits durch die Auswertung der zehn häufigsten Transkriptionsfaktoren und deren Bindungsstellen innerhalb der untersuchten DNA-Region wird deutlich, dass es in bestimmten DNA-Regionen enge Überlappungen von Transkriptionsfaktorbindungsstellen gibt (Abbildung 6). So auch im Bereich der HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen.

Unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation konnte demonstriert werden, dass HNF1 $\alpha$  ein bedeutender aktivierender Transkriptionsfaktor der *FNTB-F2*-Variante ist. Die Promotoraktivität unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation war signifikant höher als ohne HNF1 $\alpha$ -Stimulation. Es wurde zudem deutlich, dass die Aktivitätszunahme unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation eng mit den drei experimentell verifizierten Bindungsstellen in Zusammenhang steht. So zeigte sich zwar bereits beim kürzesten Promotorkonstrukt -307/+8 eine messbare Aktivitätszunahme unter HNF1 $\alpha$ -Stimulation, doch erst als die Konstrukte mindestens eine der experimentell verifizierten Bindungsstellen beinhalteten, war die Aktivitätszunahme zum unstimulierten Konstrukt statistisch signifikant (ab Konstrukt -652/+8). Bei den vier längsten Deletionskonstrukten, die alle drei verifizierten Bindungsstellen beinhalteten, war die stärkste Aktivitätszunahme gegenüber den unstimulierten Konstrukten zu messen. Während sich die Bindungsstelle -402/-426 im Kernpromotorbereich befindet, liegen die Bindungsstellen -972/-996 und -979/-1003 in 5'-Richtung ca. 450 bp vor dem

Kernpromotorbereich. Somit sind also auch die Bereiche vor der Kernpromotorregion eindeutig zum *FNTB-F2*-Promotor zu rechnen.

HNF1 $\alpha$  gehört zur Gruppe der homeodomain Transkriptionsfaktoren und ist an der Regulation der normalen Leber- und Nierenfunktion beteiligt (Costa et al., 2003). Er wird vor allem in der Leber, der Niere, dem Verdauungstrakt und im Pankreas exprimiert (Garcia-Gonzalez et al., 2016). In der Leber reguliert er die Expression einer ganzen Gruppe von leberspezifischen Proteinen wie  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -fibrinogen und Albumin (Pontoglio et al., 1996). Neben der in dieser Arbeit gezeigten Bedeutung von HNF1 $\alpha$  bei der Regulation der *FNTB-F2*-Variante konnte auch bereits für weitere Enzyme, die an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt sind, eine Bedeutung von HNF1 $\alpha$  belegt werden. So konnten Lauc et al. zeigen, dass HNF1 $\alpha$  essentiell für die Regulation der Fucosylierung ist. Eine Form der Glykosylierung bei der der Zucker L-Fucose auf Proteine übertragen wird. Interessanterweise existieren auch bei der Fucosyltransferase mehrere Isoformen dieses Enzyms. Der Knockdown von HNF1 $\alpha$  führte zur signifikanten Verminderung der Expression aller Varianten mit Ausnahme einer Variante (Lauc et al., 2010). HNF1 $\alpha$  scheint demnach ein wichtiger regulatorischer Transkriptionsfaktor für Enzyme, die posttranslationale Modifikationen katalysieren, zu sein.

#### **4.5. Assoziationen zwischen HNF1 $\alpha$ und Farnesylierung bei Diabetes mellitus**

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im HNF1 $\alpha$ -Gen zur Manifestation des sog. MODY Diabetes, Typ 3 führen (Yamagata et al., 1996). Dabei handelt es sich um eine genetisch bedingte Diabetesform, die autosomal dominant vererbt wird und sich vor dem 25. Lebensjahr manifestiert. (Messaaoui et al., 2016). Die Mutation im HNF1 $\alpha$ -Gen verursacht Störungen bei der glukosegetriggerten Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, wobei der zugrunde liegende molekulare Mechanismus bisher noch nicht restlos aufgeklärt werden konnte. Dukes et al. (Dukes et al., 1998) konnten im Mausmodell zeigen, dass es bei HNF1 $\alpha$  defizienten Mäusen zu Störungen im Stoffwechsel- und Signalweg innerhalb der  $\beta$ -Zellen des Pankreas kommt. Die glukosegetriggerte Ausschüttung von Insulin ist in HNF1 $\alpha$  defizienten Mäusen reduziert.

Es konnte gezeigt werden, dass dies vermutlich auf einen Defekt der NADH-Produktion innerhalb der Glykolyse oder dessen Transport in die Mitochondrien beruht, was dann sekundär zu einer verminderten ATP-Produktion auf Glukosestimulus führt. Darüber hinaus konnten Pongratz et al. (Pongratz et al., 2009) zeigen, dass neben diesen Effekten auf die Glykolyse ein Fehlen von HNF1 $\alpha$  auch über eine Entkopplung in der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zur reduzierten glukoseinduzierten Insulinausschüttung in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas führt. Auf der anderen Seite konnten Matti et al. (Matti et al., 2012) zeigen, dass die Farnesylierung von Signalproteinen essentiell für die glukoseinduzierte Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ist. Durch die neuen Erkenntnisse aus dieser Arbeit, hinsichtlich der Bedeutung von HNF1 $\alpha$  bei der Regulation der *FNTB*-F2-Variante, kann daher nun die Hypothese aufgestellt werden, dass im speziellen die neu identifizierte *FNTB*-F2-Variante an der Farnesylierung der Signalproteine für die glukoseinduzierte Insulinsekretion beteiligt ist. Darüber hinaus scheint HNF1 $\alpha$  in diesem Fall essentiell für die Genexpression der *FNTB*-F2-Variante in  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu sein.

## 4.6 Ausblick

Die Erforschung der Ursachen und zugrundeliegenden molekularen Mechanismen für den insgesamt eher nur geringen Erfolg von Farnesyltransferasehemmstoffen am Menschen, stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um in einem weiteren Schritt ggf. eine Therapieanpassung vornehmen zu können, mit dem Ziel eine Therapieoptimierung zu erreichen. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von Farnesyltransferasehemmstoffen in einer humanen Kolonkarzinom Zelllinien dazu führt, dass essentielle Zielproteine der Farnesyltransferase wie K-Ras und N-Ras zwar nun nicht mehr farnesyliert werden, dafür aber alternativ durch die GGTase-I geranylgeranyliert werden und danach ebenfalls ihre volle Funktion in Signalkaskaden wahrnehmen können (Whyte et al., 1997). Da alle bisher entwickelten Farnesyltransferasehemmstoffe ihre hemmende Wirkung über die  $\beta$ -Untereinheit der FTase vermitteln, bietet die Entdeckung der verschiedenen Varianten der  $\beta$ -Untereinheit einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungen. So wäre es denkbar, dass durch die bisher entwickelten Farnesyltransferasehemmstoffe nicht alle Varianten gleichermaßen gehemmt werden. Kompensatorisch könnte die Genexpression der nicht

gehemmten Varianten zunehmen. Diese Hypothese würde auch zu der in dieser Arbeit beobachteten nur geringen basalen Promotoraktivität der *FNTB-F2*-Variante passen, die somit noch ausreichenden Regulationsspielraum bieten würde. Die Erforschung der Auswirkungen der bisher entwickelten Farnesyltransferasehemmstoffe auf die *FNTB-F2*-Aktivität und Genexpression stellt somit eine interessante weitere Forschungsfrage dar.

Insgesamt konnte das Ziel der Arbeit - die Identifikation und funktionelle Charakterisierung der *FNTB-F2*-Promotorregion - erreicht werden. Gleichzeitig ergaben sich während der experimentellen Arbeit an zahlreichen Stellen jedoch weitere interessante Fragestellungen und Hypothesen, denen in Zukunft nachgegangen werden sollte. Die experimentelle Evaluation des regulatorischen Einflusses der identifizierten promotortypischen Elemente auf die *FNTB-F2*-Promotoraktivität stellt dabei einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Forschungen am *FNTB-F2*-Promotor dar. Durch das gezielte Einbringen von Mutationen in die TATA-Bindungssequenz innerhalb der Deletionskonstrukte und deren anschließende Messung und Vergleich zu den korrespondierenden Konstrukten ohne Mutation, wäre beispielsweise eine Aussage über den Einfluss der einzelnen TATA-Boxen auf die basale Promotoraktivität möglich. Dieses Vorgehen wurde bereits von Batarseh et al. angewandt, um den regulatorischen Einfluss von GC-Boxen auf die Promotoraktivität des humanen Translokator Proteins zu evaluieren (Batarseh et al., 2012). Darüber hinaus würde sich ein gleichartiges Vorgehen bei den beiden CCAAT-Boxen anbieten, um den vermuteten negativ regulatorischen Einfluss des Transkriptionsfaktors NF-Y über diese beiden Sequenzmotive zu evaluieren. Eine weitere Möglichkeit um den Einfluss der genannten Sequenzmotive auf die *FNTB-F2*-Promotoraktivität zu evaluieren wäre es, die Aktivität der Deletionskonstrukte unter Stimulation mit Transkriptionsfaktoren zu messen, die typischerweise an diese Sequenzmotive binden (z.B. Sp1 bei GC-Boxen und NF-Y bei CCAAT-Boxen).

Eine weitere interessante Fragestellung ist, ob die Expression der *FNTB-F2*-Variante in HEPG2-Zellen unter Stimulation mit HNF1 $\alpha$  ähnlich stark gesteigert werden kann, wie dies von Chiang et al. analog für CYP3A4 in HEPG2-Zellen durch HNF1 $\alpha$ -Stimulation gezeigt werden konnte (Chiang et al., 2014).

Es bietet sich zudem an den Bereich von 300 bp direkt vor dem Translationsstartpunkt - der ja nach den Erkenntnissen aus den basalen Promotoraktivitätsmessungen die Hauptaktivitätsregion darstellt - noch genauer zu untersuchen. Durch die Erstellung von weiteren Deletionskonstrukten von diesem Bereich wäre es demnach denkbar den Hauptaktivitätsbereich noch weiter einzugrenzen. Da in diesem Bereich vier

promotortypische Elemente lokalisiert sind (eine CCAAT-Box und drei TATA-Boxen) wäre durch die Erstellung von zusätzlichen Deletionskonstrukten außerdem eine indirekte Aussage über den regulatorischen Beitrag dieser Sequenzmotive auf die Promotoraktivität möglich.

Um den Einfluss des in dieser Arbeit ebenfalls identifizierten negativ regulatorischen Transkriptionsfaktors HBP1 auf die *FNTB*-F2-Promotoraktivität experimentell zu evaluieren, würde es sich zudem anbieten, die Genexpression dieses Faktors herab zu regulieren und dann den Effekt auf die Promotoraktivität der *FNTB*-F2-Variante zu messen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die humane Farnesyltransferase steht im Fokus intensiver onkologischer und anderer pathophysiologischer Forschung. Das Enzym überträgt eine Farnesylgruppe auf Proteine, wodurch sich diese an die Zellmembran anheften und so ihre Funktion innerhalb von Signalkaskaden wahrnehmen können. Hemmstoffe der Farnesyltransferase zeigten zwar im Tiermodell große Erfolge, ihr Einsatz bei Malignomen des Menschen verlief allerdings bislang wenig erfolgreich. Um eine Optimierung zu erreichen sind weitere Erkenntnisse über die Regulation und Funktion der Farnesyltransferase essentiell. Das Enzym besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Bachmann et al. konnten zeigen, dass neben der bekannten *FNTB*-F1-Variante, mindestens vier weitere Varianten der  $\beta$ -Untereinheit existieren. Da über die Regulation dieser Varianten bislang nichts bekannt ist, war das Ziel dieser Arbeit die Promotorregion einer dieser Varianten zu charakterisieren (*FNTB*-F2). Es wurde ein Bereich von ca. 2000 bp vor dem Translationsstartpunkt der *FNTB*-F2-Variante als Promotorregion der *FNTB*-F2-Variante identifiziert. Dieser Bereich weist signifikante basale Promotoraktivität in HEK-293-Zellen auf, wobei der Hauptaktivitätsbereich auf einen DNA-Abschnitt von ca. 300 bp unmittelbar vor dem Translationsstartpunkt lokalisiert werden konnte. Die Kernpromotorregion umfasst einen Bereich von ca. 500 bp vor dem Translationsstartpunkt. Diese Region ist essentiell für die basale Promotoraktivität. In dieser Region befinden sich sechs promotortypische Elemente und der experimentell ermittelte Haupttranskriptionsstartpunkt ist direkt am Beginn dieses Bereiches lokalisiert (zwischen -519 und -488 bp). Der Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  wurde als regulatorischer Faktor der *FNTB*-F2-Variante identifiziert. Von 12 *in silico* vorhergesagten HNF1 $\alpha$ -Bindungsstellen innerhalb der untersuchten *FNTB*-F2-Promotorregion konnten drei Bindungsstellen bei -402/-426, -972/-996 und -979/-1003 mittels EMSA bestätigt werden. Unter Stimulation mit diesem Faktor zeigte sich zudem in HEK-293-Zellen eine bis zu 7-fache Erhöhung der Promotoraktivität.

Es gelang die Beschreibung des *FNTB*-F2-Promotors und die Identifizierung sowie anschließende Evaluierung des funktionellen Einflusses des spezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  auf die Promotoraktivität. Die Ergebnisse können als Grundlage für weitere klinische Forschungen dienen. Insbesondere aufgrund der gezeigten relevanten Abhängigkeit der *FNTB*-F2-Promotoraktivität vom Transkriptionsfaktor HNF1 $\alpha$  könnte in Zukunft auch bei weiteren Erkrankungen Hinweise für eine mögliche Bedeutsamkeit der *FNTB*-F2-Variante aufgedeckt werden. Ähnlich wie dies in dieser Arbeit bereits für den MODY Diabetes, Typ 3 aufgezeigt werden konnte.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Anish, R., Hossain, M. B., Jacobson, R. H., Takada, S. (2009). Characterization of transcription from TATA-less promoters: identification of a new core promoter element XCPE2 and analysis of factor requirements. *PLoS One* 4, e5103.
2. Bachmann, H. S., Siffert, W., Frey, U. H. (2003). Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics* 13, 759-766.
3. Batarseh, A., Barlow, K. D., Martinez-Arguelles, D. B., Papadopoulos, V. (2012). Functional characterization of the human translocator protein (18kDa) gene promoter in human breast cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1819, 38-56.
4. Berasi, S. P., Xiu, M., Yee, A. S., Paulson, K. E. (2004). HBP1 repression of the p47phox gene: cell cycle regulation via the NADPH oxidase. *Mol Cell Biol* 24, 3011-3024.
5. Bernadt, C. T., Nowling, T., Wiebe, M. S., Rizzino, A. (2005). NF-Y behaves as a bifunctional transcription factor that can stimulate or repress the FGF-4 promoter in an enhancer-dependent manner. *Gene Expr* 12, 193-212.
6. Berndt, N., Hamilton, A. D., Sebt, S. M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 775-791.
7. Brooks, S. A. (2006). Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert Rev Proteomics* 3, 345-359.
8. Casey, P. J. (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 219-225.
9. Castell, J. V., Jover, R., Martinez-Jimenez, C. P., Gomez-Lechon, M. J. (2006). Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 183-212.
10. Chatterjee, S., Mayor, S. (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* 58, 1969-1987.
11. Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S., Siebert, P. D. (1996). Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques* 21, 526-534.

12. Chiang, T. S., Yang, K. C., Chiou, L. L., Huang, G. T., Lee, H. S. (2014). Enhancement of CYP3A4 activity in Hep G2 cells by lentiviral transfection of hepatocyte nuclear factor-1 alpha. *PLoS One* 9, e94885.
13. Costa, R. H., Kalinichenko, V. V., Holterman, A. X., Wang, X. (2003). Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* 38, 1331-1347.
14. Dolfini, D., Gatta, R., Mantovani, R. (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47, 29-49.
15. Dolfini, D., Zambelli, F., Pavesi, G., Mantovani, R. (2009). A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell Cycle* 8, 4127-4137.
16. Dukes, I. D., Sreenan, S., Roe, M. W., Levisetti, M., Zhou, Y. P., Ostrega, D., Bell, G. I., Pontoglio, M., Yaniv, M., Philipson, L., Polonsky, K. S. (1998). Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 273, 24457-24464.
17. Duluc, L., Ahmetaj-Shala, B., Mitchell, J., Abdul-Salam, V. B., Mahomed, A. S., Aldabbous, L., Oliver, E., Iannone, L., Dubois, O. D., Storck, E. M., Tate, E. W., Zhao, L., Wilkins, M. R., Wojciak-Stothard, B. (2017). Tipifarnib prevents development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 113, 276-287.
18. Eisenhaber, B., Bork, P., Eisenhaber, F. (2001). Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng* 14, 17-25.
19. End, D. W., Smets, G., Todd, A. V., Applegate, T. L., Fuery, C. J., Angibaud, P., Venet, M., Sanz, G., Poignet, H., Skrzat, S., Devine, A., Wouters, W., Bowden, C. (2001). Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res* 61, 131-137.
20. Frith, M. C., Valen, E., Krogh, A., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Sandelin, A. (2008). A code for transcription initiation in mammalian genomes. *Genome Res* 18, 1-12.
21. Garcia-Gonzalez, M. A., Carette, C., Bagattin, A., Chiral, M., Makinistoglu, M. P., Garbay, S., Prevost, G., Madaras, C., Herault, Y., Leibovici, M., Pontoglio, M. (2016). A suppressor locus for MODY3-diabetes. *Sci Rep* 6, 33087.
22. Gordon, J. I., Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P., Gokel, G. W. (1991). Protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 266, 8647-8650.



23. Gordon, L. B., Kleinman, M. E., Miller, D. T., Neuberg, D. S., Giobbie-Hurder, A., Gerhard-Herman, M., Smoot, L. B., Gordon, C. M., Cleveland, R., Snyder, B. D., Fligor, B., Bishop, W. R., Statkevich, P., Regen, A., Sonis, A., Riley, S., Ploski, C., Correia, A., Quinn, N., Ullrich, N. J., Nazarian, A., Liang, M. G., Huh, S. Y., Schwartzman, A., Kieran, M. W. (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666-16671.
24. Gstraunthaler, G. (2013). *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen* Vol. 7, S. 354. Heidelberg: Springer Spektrum
25. Harries, L. W., Brown, J. E., Gloyn, A. L. (2009). Species-specific differences in the expression of the HNF1A, HNF1B and HNF4A genes. *PLoS One* 4, e7855.
26. Hart, S. N., Li, Y., Nakamoto, K., Subileau, E. A., Steen, D., Zhong, X. B. (2010). A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos* 38, 988-994.
27. Hennig, W. (2010): *Genetik* (Vol. 5). Berlin Heidelberg: Springer.
28. Hougland, J. L., Hicks, K. A., Hartman, H. L., Kelly, R. A., Watt, T. J., Fierke, C. A. (2010). Identification of novel peptide substrates for protein farnesyltransferase reveals two substrate classes with distinct sequence selectivities. *J Mol Biol* 395, 176-190.
29. Jullien, N., Herman, J. P. (2011). LUEGO: a cost and time saving gel shift procedure. *Biotechniques* 51, 267-269.
30. Knippers, R. (2001): *Molekulare Genetik*. Stuttgart: Georg Thieme.
31. Kohl, N. E., Omer, C. A., Conner, M. W., Anthony, N. J., Davide, J. P., deSolms, S. J., Giuliani, E. A., Gomez, R. P., Graham, S. L., Hamilton, K., et al. (1995). Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med* 1, 792-797.
32. Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148.
33. Kuo, C. J., Mendel, D. B., Hansen, L. P., Crabtree, G. R. (1991). Independent regulation of HNF-1 alpha and HNF-1 beta by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Embo j* 10, 2231-2236.
34. Lancet, J. E., Gojo, I., Gotlib, J., Feldman, E. J., Greer, J., Liesveld, J. L., Bruzek, L. M., Morris, L., Park, Y., Adjei, A. A., Kaufmann, S. H., Garrett-Mayer, E., Greenberg, P. L., Wright, J. J., Karp, J. E. (2007). A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly

- patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood* 109, 1387-1394.
35. Lauc, G., Essafi, A., Huffman, J. E., Hayward, C., Knezevic, A., Kattla, J. J., Polasek, O., Gornik, O., Vitart, V., Abrahams, J. L., Pucic, M., Novokmet, M., Redzic, I., Campbell, S., Wild, S. H., Borovecki, F., Wang, W., Kolcic, I., Zgaga, L., Gyllensten, U., Wilson, J. F., Wright, A. F., Hastie, N. D., Campbell, H., Rudd, P. M., Rudan, I. (2010). Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1alpha as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet* 6, e1001256.
  36. Lazik, A. (2010). Polymorphismen im Promotor des Gens FNTB und deren mögliche Bedeutung bei malignen Neoplasien. Online-Publikation. [http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-27666/Diss\\_Lazik.pdf](http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-27666/Diss_Lazik.pdf)
  37. Marshall, C. J. (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* 259, 1865-1866.
  38. Matti, A., Kyathanahalli, C., Kowluru, A. (2012). Protein farnesylation is requisite for mitochondrial fuel-induced insulin release: further evidence to link reactive oxygen species generation to insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Islets* 4, 74-77.
  39. Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Eisenhaber, F. (2002). N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J Mol Biol* 317, 523-540.
  40. Maurer-Stroh, S., Washietl, S., Eisenhaber, F. (2003). Protein prenyltransferases. *Genome Biol* 4, 212.
  41. Mazumder, B., Seshadri, V., Fox, P. L. (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28, 91-98.
  42. Meier, W., du Bois, A., Rau, J., Gropp-Meier, M., Baumann, K., Huober, J., Wollschlaeger, K., Kreienberg, R., Canzler, U., Schmalfeldt, B., Wimberger, P., Richter, B., Schroder, W., Belau, A., Stahle, A., Burges, A., Sehouli, J. (2012). Randomized phase II trial of carboplatin and paclitaxel with or without Isonafarnib in first-line treatment of epithelial ovarian cancer stage IIB-IV. *Gynecol Oncol* 126, 236-240.
  43. Merza, M., Awla, D., Hwaiz, R., Rahman, M., Appelros, S., Abdulla, A., Regner, S., Thorlacius, H. (2014). Farnesyltransferase regulates neutrophil recruitment and tissue damage in acute pancreatitis. *Pancreas* 43, 427-435.
  44. Messaaoui, A., Tenoutasse, S., Dorchy, H. (2016). [Maturity onset diabetes of the young: just think about it]. *Rev Med Brux* 37, 95-100.

45. Morello, J. P.,Bouvier, M. (1996). Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. *Biochem Cell Biol* 74, 449-457.
46. Mülhardt, C. (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics* (Vol. 7). Heidelberg: Springer Spektrum.
47. Nabokina, S. M., Valle, J. E.,Said, H. M. (2013). Characterization of the human mitochondrial thiamine pyrophosphate transporter SLC25A19 minimal promoter: a role for NF-Y in regulating basal transcription. *Gene* 528, 248-255.
48. O'Connor, L., Gilmour, J.,Bonifer, C. (2016). The Role of the Ubiquitously Expressed Transcription Factor Sp1 in Tissue-specific Transcriptional Regulation and in Disease. *Yale J Biol Med* 89, 513-525.
49. Palsuledesai, C. C.,Distefano, M. D. (2015). Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. *ACS Chem Biol* 10, 51-62.
50. Pan, K., Chen, Y., Roth, M., Wang, W., Wang, S., Yee, A. S.,Zhang, X. (2013). HBP1-mediated transcriptional regulation of DNA methyltransferase 1 and its impact on cell senescence. *Mol Cell Biol* 33, 887-903.
51. Park, H. J.,Choi, J. H. (2014). Identification and Functional Characterization of Novel Genetic Variations in the OCTN1 Promoter. *Korean J Physiol Pharmacol* 18, 169-175.
52. Park, H. W., Boduluri, S. R., Moomaw, J. F., Casey, P. J.,Beese, L. S. (1997). Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. *Science* 275, 1800-1804.
53. Pickering, B. M.,Willis, A. E. (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16, 39-47.
54. Pongratz, R. L., Kibbey, R. G., Kirkpatrick, C. L., Zhao, X., Pontoglio, M., Yaniv, M., Wollheim, C. B., Shulman, G. I.,Cline, G. W. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to impaired insulin secretion in INS-1 cells with dominant-negative mutations of HNF-1alpha and in HNF-1alpha-deficient islets. *J Biol Chem* 284, 16808-16821.
55. Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J. P., Babinet, C.,Yaniv, M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84, 575-585.
56. Prakash, T., Sharma, V. K., Adati, N., Ozawa, R., Kumar, N., Nishida, Y., Fujikake, T., Takeda, T.,Taylor, T. D. (2010). Expression of conjoined

- genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes. PLoS One 5, e13284.
57. Rao, S., Cunningham, D., de Gramont, A., Scheithauer, W., Smakal, M., Humblet, Y., Kourteva, G., Iveson, T., Andre, T., Dostalova, J., Illes, A., Belly, R., Perez-Ruixo, J. J., Park, Y. C., Palmer, P. A. (2004). Phase III double-blind placebo-controlled study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with refractory advanced colorectal cancer. J Clin Oncol 22, 3950-3957.
  58. Reese, J. C. (2003). Basal transcription factors. Curr Opin Genet Dev 13, 114-118.
  59. Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim Biophys Acta 1451, 1-16.
  60. Seabra, M. C., Reiss, Y., Casey, P. J., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1991). Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common alpha subunit. Cell 65, 429-434.
  61. Senkel, S., Lucas, B., Klein-Hitpass, L., Ryffel, G. U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. Biochim Biophys Acta 1731, 179-190.
  62. Shi, W., Zhou, W. (2006). Frequency distribution of TATA Box and extension sequences on human promoters. BMC Bioinformatics 7 Suppl 4, S2.
  63. Smale, S. T., Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. Annu Rev Biochem 72, 449-479.
  64. Sousa, S. F., Fernandes, P. A., Ramos, M. J. (2005). Unraveling the mechanism of the farnesyltransferase enzyme. J Biol Inorg Chem 10, 3-10.
  65. Sparano, J. A., Moulder, S., Kazi, A., Coppola, D., Negassa, A., Vahdat, L., Li, T., Pellegrino, C., Fineberg, S., Munster, P., Malafa, M., Lee, D., Hoschander, S., Hopkins, U., Hershman, D., Wright, J. J., Kleer, C., Merajver, S., Sebt, S. M. (2009). Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer. Clin Cancer Res 15, 2942-2948.
  66. Strachan, T., Read, A. P. (2005): Molekulare Humangenetik (Vol. 3.). München: Elsevier.
  67. Thomas, M. C., Chiang, C. M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. Crit Rev Biochem Mol Biol 41, 105-178.

68. Todd, A. K., Neidle, S. (2008). The relationship of potential G-quadruplex sequences in cis-upstream regions of the human genome to SP1-binding elements. *Nucleic Acids Res* 36, 2700-2704.
69. Van Cutsem, E., van de Velde, H., Karasek, P., Oettle, H., Vervenne, W. L., Szawlowski, A., Schoffski, P., Post, S., Verslype, C., Neumann, H., Safran, H., Humblet, Y., Perez Ruixo, J., Ma, Y., Von Hoff, D. (2004). Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 22, 1430-1438.
70. Wang, J. M., Lang, B., Zhu, H. Y., Du, H. T., Tian, Y. M., Su, Y. H. (2014). Cloning and transcriptional activity analysis of the porcine cofilin 2 gene promoter. *Gene* 547, 280-287.
71. Whyte, D. B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T. N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J. J., Bishop, W. R., Pai, J. K. (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* 272, 14459-14464.
72. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X., Cox, N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S., Bell, G. I., et al. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384, 455-458.
73. Yang, Y., Chakravorty, D. K., Merz, K. M., Jr. (2010). Finding a needle in the haystack: computational modeling of Mg<sup>2+</sup> binding in the active site of protein farnesyltransferase. *Biochemistry* 49, 9658-9666.
74. Zhang, F. L., Casey, P. J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65, 241-269.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumperoxidsulfat
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CENP-E	Centromere protein E
CENP-F	Centromere protein F
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
Dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GABPβ	GA Binding Protein Transcription Factor beta

ggf.	Gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
HSV-TK	Herpes simplex virus - thymidine kinase
LUC	Luciferase
LUEGO	Labeled universal electrophoretic gel shift oligonucleotide
MEM	Minimum Essential Medium
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OliN	Oligonukleotid
p.a.	pro analysi
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	Pyrococcus furiosus
RAS	Rat sarcoma
RheB	Ras homolog enriched in brain
RhoB	Ras homolog family, member B
RhoE	Ras homolog family, member E
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA/mRNA	Ribonukleotidsäure/m = messenger (Boten-)
RT	Raumtemperatur

SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
Z.B.	Zum Beispiel
Zn	Zink

### Einheiten

kDa	Kilodalton
cm.	Zentimeter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
nm	Nanometer
l	Liter
ml	Milliliter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
g	Gramm
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
ng	Nanogramm



mM	Milli Mol
M	molare Malle (Mol)
OD	Optische Dichte
u	Units (Einheiten)
pmol	Pikomol
fmol	Femtomol
Sek.	Sekunden
Min.	Minuten
h	Stunden
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
mA	Milliampere
V	Volt

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht  
enthalten